

日 本 国 特 許 庁  
JAPAN PATENT OFFICE

別紙添付の書類に記載されている事項は下記の出願書類に記載されている事項と同一であることを証明する。

This is to certify that the annexed is a true copy of the following application as filed with this Office.

出 願 年 月 日

Date of Application:

2 0 0 4 年 5 月 1 3 日

出 願 番 号

Application Number:

特願 2 0 0 4 - 1 4 3 9 0 2

パリ条約による外国への出願  
に用いる優先権の主張の基礎  
となる出願の国コードと出願  
番号

The country code and number  
of your priority application,  
to be used for filing abroad  
under the Paris Convention, is

J P 2 0 0 4 - 1 4 3 9 0 2

出 願 人

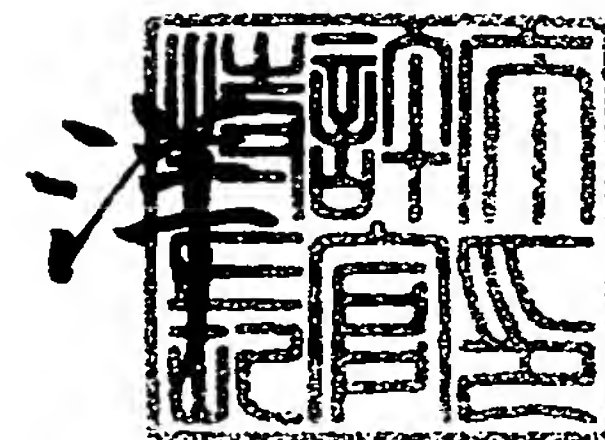
Applicant(s):

第一製薬株式会社

2 0 0 5 年 6 月 8 日

特許庁長官  
Commissioner,  
Japan Patent Office

小 川



BEST AVAILABLE COPY

【書類名】	付訂願
【整理番号】	NP03-1177
【あて先】	特許庁長官殿
【国際特許分類】	A61P 35/00 C12N 09/00
【発明者】	
【住所又は居所】	東京都江戸川区北葛西1丁目16番13号 第一製薬株式会社 東京研究開発センター内
【氏名】	和田 直也
【発明者】	
【住所又は居所】	東京都江戸川区北葛西1丁目16番13号 第一製薬株式会社 東京研究開発センター内
【氏名】	岡本 貴史
【発明者】	
【住所又は居所】	東京都江戸川区北葛西1丁目16番13号 第一製薬株式会社 東京研究開発センター内
【氏名】	谷垣 佳司
【発明者】	
【住所又は居所】	千葉県千葉市美浜区中瀬1丁目3番地 幕張テクノガーデンD棟17階 セレスター・レキシコ・サイエンシズ株式会社内
【氏名】	土居 洋文
【発明者】	
【住所又は居所】	千葉県千葉市美浜区中瀬1丁目3番地 幕張テクノガーデンD棟17階 セレスター・レキシコ・サイエンシズ株式会社内
【氏名】	菊地 康裕
【発明者】	
【住所又は居所】	千葉県千葉市美浜区中瀬1丁目3番地 幕張テクノガーデンD棟17階 セレスター・レキシコ・サイエンシズ株式会社内
【氏名】	今井 建策
【特許出願人】	
【識別番号】	000002831
【氏名又は名称】	第一製薬株式会社
【特許出願人】	
【識別番号】	500520628
【氏名又は名称】	セレスター・レキシコ・サイエンシズ株式会社
【代理人】	
【識別番号】	100088904
【弁理士】	
【氏名又は名称】	庄司 隆
【電話番号】	03-3864-6572
【手数料の表示】	
【予納台帳番号】	067070
【納付金額】	16,000円
【提出物件の目録】	
【物件名】	特許請求の範囲 1
【物件名】	明細書 1
【物件名】	図面 1

【請求項1】

以下の群より選ばれるテロメラーズ活性化阻害方法；

(i) MAPKAPK3 (mitogen-activated protein kinase-activated protein kinase-3) と TERT (telomerase reverse transcriptase) の結合を阻害することを特徴とするテロメラーズ活性化阻害方法

および

(ii) 活性化型 MAPKAPK3 による TERT のリン酸化を阻害することを特徴とするテロメラーズ活性化阻害方法。

【請求項2】

MAPKAPK3 (mitogen-activated protein kinase-activated protein kinase-3) と TERT (telomerase reverse transcriptase) の結合を阻害することを特徴とするテロメラーズ活性化阻害方法。

【請求項3】

請求項1または2に記載のテロメラーズ活性化阻害方法を用いることを特徴とするテロメラーズ活性阻害方法。

【請求項4】

MAPKAPK3 (mitogen-activated protein kinase-activated protein kinase-3) の不活性化型変異体によるテロメラーズ活性阻害方法であって、該変異体が TERT (telomerase reverse transcriptase) と結合する変異体である、テロメラーズ活性阻害方法。

【請求項5】

MAPKAPK3 (mitogen-activated protein kinase-activated protein kinase-3) の不活性化型変異体が配列表の配列番号6に記載のアミノ酸配列で表される蛋白質である、請求項4に記載のテロメラーズ活性阻害方法。

【請求項6】

請求項1若しくは2に記載のテロメラーズ活性化阻害方法、および／または請求項3から5のいずれか1項に記載のテロメラーズ活性阻害方法を用いることを特徴とするテロメラーズ活性の亢進に起因する疾患の防止方法および／または治療方法。

【請求項7】

テロメラーズ活性の亢進に起因する疾患が、癌疾患である請求項6に記載のテロメラーズ活性の亢進に起因する疾患の防止方法および／または治療方法。

【請求項8】

癌疾患が、乳癌、腎細胞癌、急性白血病、グリア性腫瘍、前立腺癌、神経上皮腫、扁平上皮癌、肝細胞癌、前立腺癌および非小細胞肺癌のいずれかである請求項7に記載のテロメラーズ活性の亢進に起因する疾患の防止方法および／または治療方法。

【請求項9】

癌疾患が乳癌疾患である請求項7に記載のテロメラーズ活性の亢進に起因する疾患の防止方法および／または治療方法。

【請求項10】

MAPKAPK3 (mitogen-activated protein kinase-activated protein kinase-3) と TERT (telomerase reverse transcriptase) の結合を阻害する化合物の同定方法であって、ある化合物と MAPKAPK3 および／または TERT との相互作用を可能にする条件下、該化合物と MAPKAPK3 および／または TERT とを接触させ、次いで、MAPKAPK3 と TERT の結合により生じるシグナルおよび／またはマー

マーを用いる系を用いて、該シグナルおよび／またはマーカーの存在若しくは不存または変化を検出することにより、該化合物がMAPKAPK3とTERTの結合を阻害するか否かを決定する方法。

【請求項11】

活性化型MAPKAPK3 (mitogen-activated protein kinase-activated protein kinase-3) によるTERT (telomerase reverse transcriptase) のリン酸化を阻害する化合物の同定方法であって、ある化合物と活性化型MAPKAPK3および／またはTERTとの相互作用を可能にする条件下、該化合物と活性化型MAPKAPK3および／またはTERTとを接触させ、次いで、活性化型MAPKAPK3によるTERTのリン酸化により生じるシグナルおよび／またはマーカーを使用する系を用いて、該シグナルおよび／またはマーカーの存在若しくは不存または変化を検出することにより、該化合物が活性化型MAPKAPK3によるTERTのリン酸化を阻害するか否かを決定する方法。

【請求項12】

以下の群より選ばれるテロメラーズ活性化阻害剤；

(i) MAPKAPK3 (mitogen-activated protein kinase-activated protein kinase-3) とTERT (telomerase reverse transcriptase) の結合を阻害することを特徴とするテロメラーズ活性化阻害剤  
および

(ii) 活性化型MAPKAPK3によるTERTのリン酸化を阻害することを特徴とするテロメラーズ活性化阻害剤。

【請求項13】

以下の群より選ばれるテロメラーズ活性化阻害剤；

(i) MAPKAPK3 (mitogen-activated protein kinase-activated protein kinase-3) とTERT (telomerase reverse transcriptase) の結合を阻害する化合物を少なくとも1つ含んでなるテロメラーズ活性化阻害剤  
および

(ii) 活性化型MAPKAPK3によるTERTのリン酸化を阻害する化合物を少なくとも1つ含んでなるテロメラーズ活性化阻害剤。

【請求項14】

以下の群より選ばれるテロメラーズ活性阻害剤；

(i) MAPKAPK3 (mitogen-activated protein kinase-activated protein kinase-3) とTERT (telomerase reverse transcriptase) の結合を阻害することを特徴とするテロメラーズ活性阻害剤  
および

(ii) 活性化型MAPKAPK3によるTERTのリン酸化を阻害することを特徴とするテロメラーズ活性阻害剤。

【請求項15】

以下の群より選ばれるテロメラーズ活性阻害剤；

(i) MAPKAPK3 (mitogen-activated protein kinase-activated protein kinase-3) とTERT (telomerase reverse transcriptase) の結合を阻害する化合物を少なくとも1つ含んでなるテロメラーズ活性阻害剤  
および

(ii) 活性化型MAPKAPK3によるTERTのリン酸化を阻害する化合物を少なくとも1つ含んでなるテロメラーズ活性阻害剤。

【請求項 16】

MAPKAPK3 (mitogen-activated protein kinase-activated protein kinase-3) の不活性化型変異体を含んでなるテロメラーゼ活性阻害剤であって、該変異体が TERT (telomerase reverse transcriptase) と結合する変異体である、テロメラーゼ活性阻害剤。

【請求項 17】

MAPKAPK3 (mitogen-activated protein kinase-activated protein kinase-3) の不活性化型変異体が配列表の配列番号 6 に記載のアミノ酸配列で表される蛋白質である、請求項 16 に記載のテロメラーゼ活性阻害剤。

【請求項 18】

請求項 1 若しくは 2 に記載のテロメラーゼ活性化阻害方法を用いるテロメラーゼ活性化阻害、および／または請求項 3 から 5 のいずれか 1 項に記載のテロメラーゼ活性阻害方法を用いるテロメラーゼ活性阻害を特徴とするテロメラーゼ活性の亢進に起因する疾患の防止剤および／または治療剤。

【請求項 19】

請求項 1 2 および 13 に記載のテロメラーゼ活性化阻害剤並びに請求項 14 から 17 に記載のテロメラーゼ活性阻害剤のうち少なくともいずれか 1 つを含んでなるテロメラーゼ活性の亢進に起因する疾患の防止剤および／または治療剤。

【請求項 20】

テロメラーゼ活性の亢進に起因する疾患が、癌疾患である請求項 18 または 19 に記載のテロメラーゼ活性の亢進に起因する疾患の防止剤および／または治療剤。

【請求項 21】

癌疾患が、乳癌、腎細胞癌、急性白血病、グリア性腫瘍、前立腺癌、神経上皮腫、扁平上皮癌、肝細胞癌、前立腺癌および非小細胞肺癌のいずれかである請求項 20 に記載のテロメラーゼ活性の亢進に起因する疾患の防止剤および／または治療剤。

【請求項 22】

癌疾患が乳癌疾患である請求項 20 に記載のテロメラーゼ活性の亢進に起因する疾患の防止剤および／または治療剤。

【請求項 23】

MAPKAPK3 (mitogen-activated protein kinase-activated protein kinase-3)、MAPKAPK3 をコードするポリヌクレオチド、該ポリヌクレオチドを含有するベクターおよび該ベクターを含有する形質転換体のうちの少なくともいずれか 1 つと、TERT (telomerase reverse transcriptase)、TERT をコードするポリヌクレオチド、該ポリヌクレオチドを含有するベクターおよび該ベクターを含有する形質転換体のうちの少なくともいずれか 1 つとを含んでなる試薬キット。



【発明の名称】 テロメレース活性阻害方法および阻害剤

【技術分野】

【0001】

本発明は、MAPKAPK3 (mitogen-activated protein kinase-activated protein kinase-3) とテロメレース逆転写酵素 (telomerase reverse transcriptase、TER T) の結合を阻害すること、または活性化型MAPKAPK3によるTER Tのリン酸化を阻害することを特徴とするテロメレース活性化阻害方法、テロメレース活性阻害方法、テロメレース活性化阻害剤およびテロメレース活性阻害剤に関する。

また、MAPKAPK3不活性化型変異体によるテロメレース活性阻害方法および該変異体を含んでなるテロメレース活性阻害剤に関する。

さらに、MAPKAPK3とTER Tの結合を阻害する化合物または活性化型MAPKAPK3によるTER Tのリン酸化を阻害する化合物の同定方法に関する。

また、前記テロメレース活性化阻害方法および／または前記テロメレース活性阻害方法を用いることを特徴とするテロメレース活性の亢進に起因する疾患の防止方法および／または治療方法に関する。

さらに、前記テロメレース活性化阻害方法を用いるテロメレース活性化阻害、および／または前記テロメレース活性阻害方法を用いるテロメレース活性阻害を特徴とするテロメレース活性の亢進に起因する疾患の防止剤および／または治療剤に関する。

また、MAPKAPK3、MAPKAPK3をコードするポリヌクレオチド、該ポリヌクレオチドを含有するベクターおよび該ベクターを含有する形質転換体のうちの少なくともいずれか1つと、TER T、TER Tをコードするポリヌクレオチド、該ポリヌクレオチドを含有するベクターおよび該ベクターを含有する形質転換体のうちの少なくともいずれか1つとを含んでなる試薬キットに関する。

【背景技術】

【0002】

テロメレースは、真核細胞の染色体末端のテロメア配列の伸張反応を触媒する酵素であり、鋳型となるRNA分子であるテロメレースRNA (TR) と触媒サブユニットであるTER Tからなるリボ核蛋白質である (非特許文献1)。

【0003】

テロメレースは、テロメア長を維持することにより、細胞に不死化能 (無限寿命) を与える。テロメアは真核細胞の染色体DNAの末端部分に存在する単純な繰り返し配列であり、染色体の安定性維持に寄与している。細胞分裂においてDNAの複製を司る通常のDNAポリメラーゼではDNAの最末端まで完全に複製が行われなため、細胞分裂に伴いテロメアは短縮される。正常な体細胞では一定回数分裂後に増殖が停止し、細胞の老化あるいは細胞死が生じる。

【0004】

テロメレース活性は生殖細胞、各種幹細胞および末梢血リンパ球を除く正常細胞では検出されない。したがって、大多数の正常細胞は分裂毎にテロメア長が短縮するためテロメア長を維持することができず、その寿命は有限である。

【0005】

一方、癌細胞等不死化した細胞の大多数においては、テロメレース活性が検出される。すなわち、細胞分裂に伴い短縮されたテロメアがテロメレースにより伸張され、その結果、テロメア長が維持されることが、癌細胞の無限増殖性獲得機序の1つであると考えられる。テロメレースによるテロメア長の維持が癌細胞の不死化に寄与することは、アンチセンスRNAを用いて癌細胞のテロメレース活性を消失させると、10数回の細胞分裂の後に細胞増殖が停止し、細胞死が誘導されるという報告により明らかである。また、癌細胞内でドミナントネガティブ型テロメレースを発現させることにより、テロメレース活性の消失と細胞分裂に伴ったテロメア長の短小化、染色体末端融合の出現および細胞死が誘導

であることが報告されている。

#### 【0006】

テロメラーズの活性化に関しては、TERT遺伝子の発現活性化による活性化やTERTのリン酸化を介した活性化等が報告されている。前者については、多くの正常細胞においてTR遺伝子の発現は検出されるもののTERT遺伝子の発現は検出されないのに対し、多くの癌細胞ではTRおよびTERT両遺伝子の発現が認められることから、癌細胞等テロメラーズ活性が検出される細胞では何らかの機構によりTERT遺伝子の発現が活性化されていると考えられている。後者については、癌細胞の核抽出液を脱リン酸化処理すると抽出液中のテロメラーズ活性が低減することが報告されており、テロメラーズの活性化にリン酸化が関与している可能性が示唆されている（非特許文献2）。また、癌細胞由来の核抽出液をAktやプロテインキナーゼC（PKC）と反応させることにより抽出液中のテロメラーズ活性が上昇することが報告されており、これらキナーゼがテロメラーズ活性化に関与する可能性が考えられている（非特許文献3および4）。さらに、ヒト臍帯静脈内皮細胞に活性型Aktを過剰に発現させると該細胞内テロメラーズ活性の上昇が見られると報告されている（非特許文献5および6）。また、ヒト臍帯静脈内皮細胞にドミナントネガティブ型Aktを過剰に発現させることによる細胞内テロメラーゼ活性の低減が報告されている（非特許文献5および6）。さらに、PI3-キナーゼ阻害剤によるヒト臍帯静脈内皮細胞内テロメラーゼ活性の低減も報告されている（非特許文献5および6）。しかし、Aktについては、乳癌組織におけるAkt活性とその正常組織におけるAkt活性との差が見られないと報告されている（非特許文献7）。また、PKCについては、癌細胞内においてPKCがテロメラーズ活性を上昇させるか否かは不明である。なお、PKCのアイソザイムの1つであるPKCαおよびAktとMAPKAPK3とは一次構造上の相同性が低く、それぞれおよそ14.89%、23.76%の相同性を示す。PKCの他のアイソザイムとMAPKAPK3との一次構造上の相同性も同様に低い。

#### 【0007】

以下に本明細書において引用した文献を列記する。

【特許文献1】国際公開第WO01/67299号パンフレット。

【非特許文献1】ケラー（Keller C.）ら、「トレンドズ イン バイオケミカルサイエンス（TRENDS in Biochemical Sciences）」、2002年、第27巻、p. 572-579。

【非特許文献2】「ジャーナル オブ バイオロジカル ケミストリー（Journal of Biological Chemistry）」、1997年、第272巻、p. 16729-16732。

【非特許文献3】「ジャーナル オブ バイオロジカル ケミストリー（Journal of Biological Chemistry）」、1999年、第274巻、p. 13085-13090。

【非特許文献4】「ジャーナル オブ バイオロジカル ケミストリー（Journal of Biological Chemistry）」、1998年、第273巻、p. 33436-33642。

【非特許文献5】「フェブス レターズ（FEBS Letters）」、2001年、第493巻、p. 21-25。

【非特許文献6】「フェブス レターズ（FEBS Letters）」、2003年、第536巻、p. 180-186。

【非特許文献7】「インターナショナル ジャーナル オブ キャンサー（International Journal of Cancer）」、2002年、第98巻、p. 148-154。

【非特許文献8】「アメリカン ジャーナル オブ レスピレイトリー セル アンド モレキュラー バイオロジー（American Journal of Respiratory Cell and Molecular Biology）」

、2002年、第20巻、p. 330-334。

【非特許文献9】「キャンサー レターズ (Cancer Letters)」、2003年、第191巻、p. 229-237。

【非特許文献10】「ジャーナル オブ クリニカル インベスティゲーション (Journal of Clinical Investigation)」、1997年、第99巻、p. 1478-1483。

【非特許文献11】「キャンサー リサーチ (Cancer Research)」、1995年、第55巻、p. 4182-4187。

【非特許文献12】「ジャーナル オブ クリニカル インベスティゲーション (Journal of Clinical Investigation)」、1997年、第99巻、p. 1463-1464。

【非特許文献13】「ブラッド (Blood)」、1999年、第93巻、p. 3893-3899。

【非特許文献14】「アメリカン ジャーナル オブ パソロジー (American Journal of Pathology)」、1998年、第153巻、p. 1411-1423。

【非特許文献15】「ジャーナル オブ ステロイド バイオケミストリー アンド モレキュラー バイオロジー (Journal of Steroid Biochemistry and Molecular Biology)」、2002年、第80巻、p. 239-256。

【非特許文献16】「パソロジー、リサーチ アンド プラクティス (Pathology, Research and Practice)」、2000年、第196巻、p. 817-826。

【非特許文献17】「パソロジー、オンコロジー リサーチ (Pathology Oncology Research)」、2001年、第7巻、p. 171-177。

【非特許文献18】「キャンサー リサーチ (Cancer Research)」、1999年、第59巻、p. 279-284。

【非特許文献19】「アンチキャンサー リサーチ (Anticancer Research)」、2001年、第21巻、p. 2733-2738。

【非特許文献20】「キャンサー リサーチ (Cancer Research)」、2001年、第61巻、p. 6500-6510。

【非特許文献21】「ヘパトロジー (Hepatology)」、1998年、第27巻、p. 951-958。

【非特許文献22】「ジャーナル オブ ウロロジー (Journal of Urology)」、1999、第162巻、p. 1537-1542。

【非特許文献23】ウルマー (K. M. Ulmer)、 「サイエンス (Science)」、1983年、第219巻、p. 666-671。

【非特許文献24】「ペプチド合成」、丸善株式会社、1975年。

【非特許文献25】「ペプチド シンテシス (Peptide Synthesis)」、インターサイエンス (Interscience)、ニューヨーク (New York)、1996年。

【非特許文献26】「モレキュラー アンド セルラー バイオロジー (Molecular and Cellular Biology)」、1996年、第16巻、p. 6687-6697。

【非特許文献27】キム (Kim N. W.) ら、 「サイエンス (Science)」、1994年、第266巻、第5193号、p. 2011-2015。

【非特許文献28】ウェン (Wenz C.) ら、 「ザ エンボ ジャーナル (The EMBO Journal)」、2001年、第20巻、第13号、p. 3526-3534。



【非特許文献29】「*Journal of Cellular Biochemistry*」、1996年、第13巻、第10号、p. 2265-2274。

【非特許文献30】ナカムラ (Nakamura Y.) ら、「*Clinical Chemistry*」、1999年、第45巻、第10号、p. 1718-1724。

【非特許文献31】マエサワ (Maesawa C.) ら、「*Nucleic Acids Research*」、2003年、第31巻、第2号、p. E4-4。

【非特許文献32】「*Biotechniques*」、2002年、第32巻、第5号、p. 1154-1156、1158、1160。

【非特許文献33】パディソン (Paddison P. J.) ら、「*Genes and Development*」、2002年、第16巻、p. 948-958。

#### 【発明の開示】

#### 【発明が解決しようとする課題】

##### 【0008】

本発明の課題は、テロメレーズの活性化に関与する蛋白質を見出して提供することである。また、本発明の課題には、テロメレーズの活性化を阻害する手段を提供することが含まれる。さらに、本発明の課題には、テロメレーズ活性の亢進に起因する疾患、例えば癌疾患の防止および／または治療を可能にする手段を提供することが含まれる。

#### 【課題を解決するための手段】

##### 【0009】

上記課題を解決すべく本発明者らは鋭意努力し、テロメレーズの触媒サブユニットであるTERTがMAPKAPK3 (mitogen-activated protein kinase-activated protein kinase-3) と相互作用することをインシリコ (in silico) で予測した。そして、MAPKAPK3がTERTと結合すること、およびテロメレーズ活性が活性化型MAPKAPK3の用量依存的に上昇することを実験的に証明して本発明を完成した。

##### 【0010】

すなわち、本発明は、

1. 以下の群より選ばれるテロメレーズ活性化阻害方法；

(i) MAPKAPK3 (mitogen-activated protein kinase-activated protein kinase-3) とTERT (telomerase reverse transcriptase) の結合を阻害することを特徴とするテロメレーズ活性化阻害方法

および

(ii) 活性化型MAPKAPK3によるTERTのリン酸化を阻害することを特徴とするテロメレーズ活性化阻害方法、

2. MAPKAPK3 (mitogen-activated protein kinase-activated protein kinase-3) とTERT (telomerase reverse transcriptase) の結合を阻害することを特徴とするテロメレーズ活性化阻害方法、

3. 前記1. または2. のテロメレーズ活性化阻害方法を用いることを特徴とするテロメレーズ活性阻害方法、

4. MAPKAPK3 (mitogen-activated protein kinase-activated protein kinase-3) の不活性化型変異体によるテロメレーズ活性阻害方法であって、該変異体がTERT (telomerase reverse transcriptase) と結合する変異体である、テロメレーズ活性阻害方法、

5. MAPKAPK3 (mitogen-activated protein ki

has been a clinically valuable protein kinase inhibitor. 本発明は至多共  
体が配列表の配列番号6のアミノ酸配列で表される蛋白質である、前記4. のテロメラー  
ス活性阻害方法、

6. 前記1. 若しくは2. のテロメラース活性化阻害方法、および／または前記3. か  
ら5. のいずれかのテロメラース活性阻害方法を用いることを特徴とするテロメラー  
スの亢進に起因する疾患の防止方法および／または治療方法、

7. テロメラース活性の亢進に起因する疾患が、癌疾患である前記6. のテロメラー  
ス活性の亢進に起因する疾患の防止方法および／または治療方法、

8. 癌疾患が、乳癌、腎細胞癌、急性白血病、グリア性腫瘍、前立腺癌、神経上皮腫、  
扁平上皮癌、肝細胞癌、前立腺癌および非小細胞肺癌のいずれかである前記7. のテロメ  
ラース活性の亢進に起因する疾患の防止方法および／または治療方法、

9. 癌疾患が乳癌疾患である前記7. のテロメラース活性の亢進に起因する疾患の防止  
方法および／または治療方法、

10. MAPKAPK3 (mitogen-activated protein kinase-activated protein kinase-3) と TERT (telomerase reverse transcriptase) の結合を阻害する  
化合物の同定方法であって、ある化合物とMAPKAPK3および／またはTERTとの  
相互作用を可能にする条件下、該化合物とMAPKAPK3および／またはTERTとを  
接触させ、次いで、MAPKAPK3とTERTの結合により生じるシグナルおよび／ま  
たはマーカーを使用する系を用いて、該シグナルおよび／またはマーカーの存在若しくは  
不存在または変化を検出することにより、該化合物がMAPKAPK3とTERTの結合  
を阻害するか否かを決定する方法、

11. 活性化型MAPKAPK3 (mitogen-activated protein kinase-activated protein kinase-3) による  
TERT (telomerase reverse transcriptase) のリン酸化を阻害する化合物の同定方法であって、ある化合物と活性化型MAPKAPK3お  
よび／またはTERTとの相互作用を可能にする条件下、該化合物と活性化型MAPKA  
PK3および／またはTERTとを接触させ、次いで、活性化型MAPKAPK3によるT  
ERTのリン酸化により生じるシグナルおよび／またはマーカーを使用する系を用いて、  
該シグナルおよび／またはマーカーの存在若しくは不存在または変化を検出することによ  
り、該化合物が活性化型MAPKAPK3によるTERTのリン酸化を阻害するか否かを  
決定する方法、

12. 以下の群より選ばれるテロメラース活性化阻害剤；

(i) MAPKAPK3 (mitogen-activated protein kinase-activated protein kinase-3) と TERT (telomerase reverse transcriptase) の結合を阻害するこ  
とを特徴とするテロメラース活性化阻害剤  
および

(ii) 活性化型MAPKAPK3によるTERTのリン酸化を阻害することを特徴とす  
るテロメラース活性化阻害剤、

13. 以下の群より選ばれるテロメラース活性化阻害剤；

(i) MAPKAPK3 (mitogen-activated protein kinase-activated protein kinase-3) と TERT (telomerase reverse transcriptase) の結合を阻害する化  
合物を少なくとも1つ含んでなるテロメラース活性化阻害剤  
および

(ii) 活性化型MAPKAPK3によるTERTのリン酸化を阻害する化合物を少なく  
とも1つ含んでなるテロメラース活性化阻害剤、

14. 以下の群より選ばれるテロメラース活性阻害剤；

(i) MAPKAPK3 (mitogen-activated protein ki

mitogen-activated protein kinase-3 (MAPKAPK3) (telomerase reverse transcriptase) の結合を阻害することを特徴とするテロメラーゼ活性阻害剤

および

(ii) 活性化型MAPKAPK3によるTERTのリン酸化を阻害することを特徴とするテロメラーゼ活性阻害剤、

15. 以下の群より選ばれるテロメラーゼ活性阻害剤；

(i) MAPKAPK3 (mitogen-activated protein kinase-3) とTERT (telomerase reverse transcriptase) の結合を阻害する化合物を少なくとも1つ含んでなるテロメラーゼ活性阻害剤

および

(ii) 活性化型MAPKAPK3によるTERTのリン酸化を阻害する化合物を少なくとも1つ含んでなるテロメラーゼ活性阻害剤、

16. MAPKAPK3 (mitogen-activated protein kinase-3) の不活性化型変異体を含んでなるテロメラーゼ活性阻害剤であって、該変異体がTERT (telomerase reverse transcriptase) と結合する変異体である、テロメラーゼ活性阻害剤、

17. MAPKAPK3 (mitogen-activated protein kinase-3) の不活性化型変異体が配列表の配列番号6に記載のアミノ酸配列で表される蛋白質である、前記16. のテロメラーゼ活性阻害剤、

18. 前記1. 若しくは2. のテロメラーゼ活性化阻害方法を用いるテロメラーゼ活性化阻害、および／または前記3. から5. のいずれかのテロメラーゼ活性阻害方法を用いるテロメラーゼ活性阻害を特徴とするテロメラーゼ活性の亢進に起因する疾患の防止剤および／または治療剤、

19. 前記12. および13. のテロメラーゼ活性化阻害剤並びに前記14. から17. のテロメラーゼ活性阻害剤のうち少なくともいずれか1つを含んでなるテロメラーゼ活性の亢進に起因する疾患の防止剤および／または治療剤、

20. テロメラーゼ活性の亢進に起因する疾患が、癌疾患である前記18. または19. のテロメラーゼ活性の亢進に起因する疾患の防止剤および／または治療剤、

21. 癌疾患が、乳癌、腎細胞癌、急性白血病、グリア性腫瘍、前立腺癌、神経上皮腫、扁平上皮癌、肝細胞癌、前立腺癌および非小細胞肺癌のいずれかである前記20. のテロメラーゼ活性の亢進に起因する疾患の防止剤および／または治療剤、

22. 癌疾患が乳癌疾患である前記20. のテロメラーゼ活性の亢進に起因する疾患の防止剤および／または治療剤、

23. MAPKAPK3 (mitogen-activated protein kinase-3)、MAPKAPK3をコードするポリヌクレオチド、該ポリヌクレオチドを含有するベクターおよび該ベクターを含有する形質転換体のうちの少なくともいずれか1つと、TERT (telomerase reverse transcriptase)、TERTをコードするポリヌクレオチド、該ポリヌクレオチドを含有するベクターおよび該ベクターを含有する形質転換体のうちの少なくともいずれか1つとを含んでなる試薬キット、に関する。

【発明の効果】

【0011】

本発明においては、テロメラーゼの触媒サブユニットであるTERTがMAPKAPK3と結合することを見出した。さらに、テロメラーゼ活性が活性化型MAPKAPK3の用量依存的に上昇することを明らかにした。これらから、TERTとMAPKAPK3が



加した後、該MAPKAPK3が生成され、該活性化型MAPKAPK3により該TERTがリン酸化され、その結果、テロメラーゼ活性が上昇すると考えられる。テロメラーゼは、細胞に不死化能（無限寿命）を与える機能を有し、癌細胞等不死化細胞においてその活性が検出されている。したがって、TERTとMAPKAPK3との結合を阻害すること、または活性化型MAPKAPK3によるテロメラーゼのリン酸化を阻害することにより、テロメラーゼの活性化を阻害することができ、その結果、テロメラーゼの活性を阻害可能である。

#### 【0012】

さらに、本発明においては、TERTと不活性化型MAPKAPK3が結合することを見出した。また、TERTと結合する不活性化型MAPKAPK3によりテロメラーゼ活性が低減することを明らかにした。これらから、TERTと結合する不活性化型MAPKAPK3は、テロメラーゼの活性化および／またはテロメラーゼを阻害することにより、テロメラーゼの活性を阻害すると考えられる。TERTと結合する不活性化型MAPKAPK3のキナーゼ活性は、MAPKAPK3および活性化型MAPKAPK3と比較し、低減または消失している。しかし、TERTと結合する不活性化型MAPKAPK3は、MAPKAPK3の基質であるTERTへの結合能を有する。したがって、TERTと結合する不活性化型MAPKAPK3は、MAPKAPK3へのTERTの結合を拮抗的に阻害することによりテロメラーゼの活性化を阻害し、その結果、テロメラーゼ活性を阻害する可能性が高い。このように、TERTと結合する不活性化型MAPKAPK3によりテロメラーゼ活性を阻害可能である。

#### 【0013】

テロメラーゼ活性化阻害およびテロメラーゼ活性阻害により、癌細胞の有限寿命化と染色体の不安定化による細胞死が誘導でき、癌疾患、例えば乳癌等の防止および／または治療が可能になる。

#### 【発明を実施するための最良の形態】

#### 【0014】

以下、本発明について発明の実施の態様をさらに詳しく説明する。

本明細書においては単離された若しくは合成の完全長蛋白質；単離された若しくは合成の完全長ポリペプチド；または単離された若しくは合成の完全長オリゴペプチドを意味する総称的用語として「蛋白質」という用語を使用することがある。ここで蛋白質、ポリペプチド若しくはオリゴペプチドはペプチド結合または修飾されたペプチド結合により互いに結合している2個以上のアミノ酸を含むものである。以降、アミノ酸を表記する場合、1文字または3文字にて表記することがある。

#### 【0015】

本発明においては、テロメラーゼの触媒サブユニットであるTERTがMAPKAPK3と相互作用することを、特許文献1に記載の方法に従ってインシリコで予測した。そして実験的に、TERTがMAPKAPK3と結合することを明らかにした。さらに、テロメラーゼ活性が活性化型MAPKAPK3の用量依存的に上昇することを明らかにした。さらに、TERTと不活性化型MAPKAPK3が結合することを見出した。また、TERTと結合する不活性化型MAPKAPK3によりテロメラーゼ活性が低減することを明らかにした。

#### 【0016】

MAPKAPK3はセリン／スレオニンキナーゼの一つであり、MAPキナーゼファミリー（ERK、p38およびJNK等）によりリン酸化されて活性化することが報告されている。MAPKAPK3の機能については黄体成熟機構への関与が報告されているのみである。また、基質としてHSP27（small heat shock protein 27）、転写因子CREB（cAMP regulatory element binding protein）および転写因子E47をリン酸化することが報告されている。しかし、これら基質とテロメラーゼとの関連についての報告はない。



MAPKAPK3を活性化することが知られているp38は乳癌組織および非小細胞肺癌組織において活性化しているという報告がある（非特許文献7-9）。また、MAPKAPK3を活性化することが知られているERKは、乳癌、腎細胞癌、急性白血病、グリア性腫瘍、前立腺癌、神経上皮腫、扁平上皮癌、肝細胞癌、前立腺癌等の癌組織において活性化しているという報告がある（非特許文献10-22）。したがって、これらの癌組織においてMAPKAPK3の活性化によりテロメラーゼが活性化するというシグナルが存在している可能性が考えられる。上述のように、MAPKAPK3がTERTと結合すること、および活性化型MAPKAPK3によりテロメラーゼ活性が上昇することを本発明において明らかにした。これらから、TERTとMAPKAPK3が結合した後、該MAPKAPK3がp38等によりリン酸化されることにより活性化型MAPKAPK3が生成され、該活性化型MAPKAPK3により該TERTがリン酸化され、その結果、テロメラーゼ活性が上昇すると考えられる。したがって、MAPKAPK3とTERTの結合を阻害すること、または活性化型MAPKAPK3によるTERTのリン酸化を阻害することにより、テロメラーゼの活性化を阻害でき、その結果、テロメラーゼ活性を阻害できると考える。さらに、本発明においては、TERTと不活性化型MAPKAPK3が結合することを見出した。また、TERTと結合する不活性化型MAPKAPK3によりテロメラーゼ活性が低減することを明らかにした。これらから、TERTと結合する不活性化型MAPKAPK3は、テロメラーゼの活性化および／またはテロメラーゼを阻害することにより、テロメラーゼの活性を阻害すると考えられる。TERTと結合する不活性化型MAPKAPK3のキナーゼ活性は、MAPKAPK3および活性化型MAPKAPK3と比較し、低減または消失している。しかし、TERTと結合する不活性化型MAPKAPK3は、MAPKAPK3の基質であるTERTへの結合能を有する。したがって、TERTと結合する不活性化型MAPKAPK3は、MAPKAPK3へのTERTの結合を拮抗的に阻害することによりテロメラーゼの活性化を阻害し、その結果、テロメラーゼ活性を阻害する可能性が高い。このように、TERTと結合する不活性化型MAPKAPK3によりテロメラーゼ活性を阻害可能である。かかるテロメラーゼ活性の阻害により、さらに、癌細胞の有限寿命化と染色体の不安定化による細胞死の誘導が可能になる。これらから、TERTと結合する不活性化型MAPKAPK3を用いること、MAPKAPK3とTERTの結合を阻害すること、または活性化型MAPKAPK3によるTERTのリン酸化を阻害することにより、癌疾患等、例えば乳癌疾患等の防止および／または治療が可能になる。

## 【 0 0 1 8 】

これら知見に基づいて達成した本発明の一態様は、MAPKAPK3とTERTの結合を阻害すること、または活性化型MAPKAPK3によるTERTのリン酸化を阻害することを特徴とするテロメラーゼ活性化阻害方法および該テロメラーゼ活性化阻害方法を用いるテロメラーゼ活性阻害方法に関する。さらに、本発明の一態様は、MAPKAPK3の不活性化型変異体によるテロメラーゼ活性阻害方法であって、該変異体がTERTと結合する変異体である、テロメラーゼ活性阻害方法に関する。好ましくは、乳癌、腎細胞癌、急性白血病、グリア性腫瘍、前立腺癌、神経上皮腫、扁平上皮癌、肝細胞癌、前立腺癌並びに非小細胞肺癌等のヒト癌組織におけるテロメラーゼ活性化阻害方法およびテロメラーゼ活性阻害方法、さらに好ましくは、ヒト乳癌組織におけるテロメラーゼ活性化阻害方法およびテロメラーゼ活性阻害方法に関する。

## 【 0 0 1 9 】

「活性化型MAPKAPK3」とは、キナーゼ活性を示すように活性化されたMAPKAPK3を意味する。MAPKAPK3がMAPキナーゼファミリー（ERK、p38およびJNK等）等によりリン酸化されて活性化したMAPKAPK3であることができる。好ましくは、MAPキナーゼファミリー等により、MAPKAPK3のアミノ酸配列第201番目と第313番目のスレオニンがリン酸化された結果、リン酸化を受ける前のMAPKAPK3と比較し、高いキナーゼ活性を示すように活性化されたMAPKAPK3



MAPKAPK3とTERTの結合阻害は、例えば、MAPKAPK3とTERTの結合を阻害する化合物を用いることにより実施できる。ここでは、このような阻害効果を有する化合物（後述する例として競合阻害効果を有するポリペプチド類、抗体および低分子化合物等が挙げられる）を阻害剤と称する。

#### 【0029】

MAPKAPK3とTERTの結合を阻害する化合物として、好ましくは当該結合を特異的に阻害する化合物、より好ましくは当該結合を特異的に阻害する低分子量化合物が挙げられる。MAPKAPK3とTERTの結合を特異的に阻害するとは、当該結合を強く阻害するが、他の蛋白質間結合は阻害しないか、弱く阻害することを意味する。

#### 【0030】

MAPKAPK3とTERTの結合を阻害する化合物として、好ましくは当該結合を特異的に阻害する低分子量化合物が挙げられる。MAPKAPK3とTERTの結合を特異的に阻害するとは、当該結合を強く阻害するが、他の蛋白質間結合は阻害しないか、弱く阻害することを意味する。

#### 【0031】

MAPKAPK3とTERTの結合を阻害する化合物としてその他に、MAPKAPK3とTERTが結合する部位のアミノ酸配列からなるポリペプチドが例示できる。かかるポリペプチドは、蛋白質間の結合を競合的に阻害することができる。かかるポリペプチドは、MAPKAPK3またはTERTのアミノ酸配列から設計し、自体公知のペプチド合成法により合成したものから、MAPKAPK3とTERTの結合を阻害するものを選択することにより得ることができる。このように特定されたポリペプチドに、1乃至数個のアミノ酸の欠失、置換、付加または挿入等の変異を導入したのも本発明の範囲に包含される。このような変異を導入したポリペプチドは、MAPKAPK3とTERTの結合を阻害するものが好ましい。変異を有するポリペプチドは天然に存在するものであってよく、また変異を導入したものであってもよい。欠失、置換、付加または挿入等の変異を導入する手段は自体公知であり、例えばウルマーの技術（非特許文献23）を利用できる。このような変異の導入において、当該ポリペプチドの基本的な性質（物性、機能または免疫学的活性等）を変化させないという観点から、例えば、同族アミノ酸（極性アミノ酸、非極性アミノ酸、疎水性アミノ酸、親水性アミノ酸、陽性荷電アミノ酸、陰性荷電アミノ酸および芳香族アミノ酸等）の間での相互の置換は容易に想定される。さらに、これら利用できるポリペプチドは、その構成アミノ基またはカルボキシル基等を、例えばアミド化修飾する等、機能の著しい変更を伴わない程度に改変が可能である。

#### 【0032】

上記ポリペプチドは、ペプチド化学において知られる一般的な方法で製造できる。例えば、成書（非特許文献24および25）に記載の方法が例示されるが、これらに限らず公知の方法が広く利用可能である。具体的には、通常の液相法および固相法によるペプチド合成法、例えばFmoc法等を挙げることができる。または市販のアミノ酸合成装置を用いて製造可能である。あるいは遺伝子工学的手法により取得することもできる。例えば目的とするポリペプチドをコードする遺伝子を宿主細胞中で発現できる組換え発現ベクターを作成し、これを適当な宿主細胞、例えば大腸菌にトランスフェクションして形質転換した後該形質転換体を培養し、次いで得られる培養物から目的とするポリペプチドを回収することにより製造可能である。

#### 【0033】

MAPKAPK3とTERTの結合の阻害は、MAPKAPK3またはTERTを認識する抗体であって、MAPKAPK3とTERTの結合を阻害する抗体を用いることによっても実施可能である。かかる抗体は、MAPKAPK3またはTERT自体、またはこれら蛋白質の断片、好ましくはMAPKAPK3とTERTが結合する部位のアミノ酸配列からなるポリペプチドを抗原として自体公知の抗体作製法により得ることができる。

#### 【0034】

「活性化型MAPKAPK3によるTERTのリン酸化」とは、活性化型MAPKAP



ハムにより、1 L H 1 で構成するノミノ酸のノツセリン、ヘレオーン双基のヒドロキシル基にアデノシン三リン酸（ATP）のγ-リン酸基が転移されることを意味する。一般的に酵素活性を有する蛋白質は、リン酸化によりその酵素活性が調節されることが多い。したがって、リン酸化によりTERTの逆転写酵素活性が促進され、その結果テロメラーゼ活性が上昇すると考えられる。

#### 【0035】

活性化型MAPKAPK3によるTERTのリン酸化、およびリン酸化されたTERTの検出は、自体公知の方法により実施できる。生体内においては、TERTとMAPKAPK3が結合した後に、該MAPKAPK3がERK、JNKおよびp38等のMAPキナーゼファミリー等により活性化されることが考えられる。しかし、実施例に示したように、変異体である活性化型MAPKAPK3はTERTと結合し、かつ活性化型MAPKAPK3の用量依存的にテロメラーゼ活性を上昇させる。したがって、活性化型MAPKAPK3とTERTとを共存させることにより、活性化型MAPKAPK3によるTERTのリン酸化を行なうことが可能である。活性化型MAPKAPK3として、MAPKAPK3のアミノ酸配列第201番目と第313番目のスレオニンをグルタミン酸に置換したMAPKAPK3変異体が好ましく例示できる。

#### 【0036】

例えば、放射性同位体で標識されたATP（例えば[γ-<sup>32</sup>P]ATP）を含むキナーゼバッファー中で活性化型MAPKAPK3とTERTとを接触させ、反応後にSDS-PAGEで反応産物を展開し、オートラジオグラフィーにより放射活性を測定することによりリン酸化されたTERTを検出し得る。

#### 【0037】

また、例えば、TERT自体を自体公知の方法によりマイクロタイタープレートのウェル上に固定した後、該ウェル内にATPおよび活性化型MAPKAPK3を添加し、TERTと活性化型MAPKAPK3を接触させ、反応後に、予めユーロピウム（Eu）標識されかつリン酸化されたTERTを認識する抗体を用いて、リン酸化されたTERTと該抗体との抗原抗体反応を行い、時間分解蛍光を検出することにより、活性化型MAPKAPK3によりリン酸化されたTERTを検出することができる。

#### 【0038】

さらに、例えば、TERTを結合させたドナービーズと活性化型MAPKAPK3とを接触させ、反応後に抗リン酸化TERT抗体を結合させたアクセプタービーズを反応溶液に添加し、両ビーズが近接したときのみ発生するシグナル（例えば、ドナービーズをレーザー照射した際に発生する一重項状態の酸素が、アクセプタービーズに含まれる蛍光物質を活性化させた結果、発生する一定波長の光）を検出することにより、活性化型MAPKAPK3によりリン酸化されたTERTを検出することができる。

#### 【0039】

また、例えば、自体公知のシンチレーションプロキシミティアッセイ法（Scintillation proximity assay、SPA）を用いて、活性化型MAPKAPK3によりリン酸化されたTERTを検出することができる。

#### 【0040】

なお、TERTのかわりに、活性化型MAPKAPK3によりリン酸化を受けるTERTの部分ポリペプチドを基質として用いることも可能である。例えば、MAPKAPK3の基質であるHSP27およびeEF2キナーゼがMAPKAPK3によりリン酸化を受ける部位についての報告から、活性化型MAPKAPK3によりリン酸化を受けるTERTの部位はRXXSの4つのアミノ酸からなる部分ポリペプチドに相当する部位と予測される。かかる部位を含むTERTの部分ポリペプチドのうち、活性化型MAPKAPK3によるリン酸化を受けることが実証されたTERTの部分ポリペプチドをTERTの代わりに基質として用いることも可能である。TERTの部分ポリペプチドは自体公知の方法により合成することができる。

#### 【0041】



活性化型MAPKAPK3によるTER Tのリン酸化を阻害する化合物を用いることにより実施できる。活性化型MAPKAPK3によるTER Tのリン酸化を阻害する化合物として、例えば、活性化型MAPKAPK3とTER Tの結合を阻害する化合物が挙げられる。活性化型MAPKAPK3とTER Tの結合を阻害する化合物は、活性化型MAPKAPK3とTER Tの相互作用を阻害できるため、活性化型MAPKAPK3によるTER Tのリン酸化を阻害すると考えられる。あるいは、活性化型MAPKAPK3によるTER Tのリン酸化を阻害する化合物として、活性化型MAPKAPK3のキナーゼ活性を阻害する化合物が挙げられる。

#### 【0042】

なお、癌細胞内のMAPKAPK3の発現をRNA干渉の手法により低下させた場合、該細胞内のテロメラーゼ活性が減弱し、それにより細胞分裂に伴う染色体末端のテロメア長の短縮化が起こり、細胞死を誘導させることができる。したがって、かかるRNA干渉の手法によりテロメラーゼ活性を減弱または消失させるsiRNA (small interfering RNA) もテロメラーゼ活性を阻害する化合物として例示可能である。

#### 【0043】

「MAPKAPK3の不活性化型変異体」とは、MAPKAPK3に、アミノ酸の欠失、置換、付加または挿入等の変異を導入したMAPKAPK3であって、MAPKAPK3および活性化型MAPKAPK3と比較しキナーゼ活性が減弱し、または消失したMAPKAPK3を意味する。MAPKAPK3の不活性化型変異体は、天然に存在するものであってもよく、人工的に変異を導入したものであってもよい。かかる変異を導入する手段は自体公知であり、例えばウルマーの技術（非特許文献23）を利用することができる。好ましくは、例えば、MAPKAPK3の、ERK、JNKおよび／またはp38等のMAPKAPK3をリン酸化および活性化するキナーゼによりリン酸化される部位、MAPKAPK3のTER Tとの結合部位およびMAPKAPK3のATPとの結合部位のうち少なくともいずれか1つの部位に変異を導入したMAPKAPK3であることができる。MAPKAPK3をリン酸化および活性化するキナーゼによりリン酸化されるMAPKAPK3の部位として、MAPKAPK3のアミノ酸配列第201番目および第313番目、MAPKAPK3とATPとの結合部位として該アミノ酸配列第73番目が報告されている（非特許文献26）。したがって、MAPKAPK3の不活性化型変異体として、MAPKAPK3のアミノ酸配列の第73番目、第201番目および第313番目のうちの少なくともいずれか1つの部位のアミノ酸に変異を導入したMAPKAPK3の不活性化型変異体を挙げることができる。

#### 【0044】

より好ましくは、MAPKAPK3の不活性化型変異体であって、かつTER Tと結合する不活性化型変異体であり得る。かかる変異体として、配列表の配列番号6に記載のアミノ酸配列で表される蛋白質を例示できる。該変異体は、MAPKAPK3のアミノ酸配列第201番目および第313番目のスレオニンがアラニンに置換されたMAPKAPK3の不活性化型変異体である。該変異体は、TER Tと結合し（実施例2および図2を参照）、またテロメラーゼ活性を有する細胞で発現させたときに、細胞内テロメラーゼ活性を低減させた（実施例4および図4を参照）。これらから、細胞内において、該変異体は、テロメラーゼの活性化および／またはテロメラーゼを阻害することにより、テロメラーゼの活性を阻害していると考えられる。

#### 【0045】

さらに好ましくは、TER Tと結合するMAPKAPK3の不活性化型変異体であって、MAPKAPK3とTER Tの結合を拮抗的に阻害するMAPKAPK3の不活性化型変異体であり得る。かかる不活性化型変異体は、該結合を阻害することによりテロメラーゼの活性化を阻害し、結果としてテロメラーゼ活性を阻害することが可能である。配列表の配列番号6に記載のアミノ酸配列で表される蛋白質は、TER Tと結合し、テロメラー

へ結合を阻害する細胞に発現させたときに、細胞内シグナルトランスフェラーゼへ結合を阻害させた。すなわち、該蛋白質は、MAPKAPK3に対してドミナントネガティブ効果を有すると考えられる。したがって、該蛋白質は、MAPKAPK3とTER Tの結合を拮抗的に阻害するMAPKAPK3の不活性化型変異体である可能性が高いと発明者は考えている。

#### 【0046】

MAPKAPK3の不活性化型変異体とTER Tの結合は、前記MAPKAPK3とTER Tの結合の検出方法と同様の方法により検出され得る。

#### 【0047】

本発明の別の態様は、MAPKAPK3とTER Tの結合を阻害する化合物の同定方法に関する。本化合物の同定方法は、自体公知の医薬品スクリーニングシステムを利用して実施可能である。例えば、調べようとする化合物（被検化合物）とMAPKAPK3および／またはTER Tとの相互作用を可能にする条件を選択し、当該条件下で、被検化合物とMAPKAPK3および／またはTER Tとを接触させ、MAPKAPK3とTER Tの結合を検出することができるシグナルおよび／またはマーカーを使用する系を用いて、このシグナルおよび／またはマーカーの存在若しくは不存在または変化を検出することにより、MAPKAPK3とTER Tの結合を阻害する化合物を同定できる。例えばMAPKAPK3とTER Tの結合により生じるシグナルまたは該結合のマーカーが、被検化合物をMAPKAPK3またはTER Tと接触させたときに消失あるいは低減する等の変化を示した場合、当該被検化合物はMAPKAPK3とTER Tの結合を阻害すると判定できる。かかる同定方法において、被検化合物をMAPKAPK3および／またはTER Tと予め接触させ、その後MAPKAPK3とTER Tの結合反応を行なうことも可能であり、または被検化合物をこれらの結合反応に共存させることも可能である。被検化合物とMAPKAPK3および／またはTER Tとの相互作用を可能にする条件は、インビトロのものであってよく、インビボのものであってもよい。例えば、MAPKAPK3とTER Tとを共発現させた細胞を用いることもできる。細胞における共発現は、MAPKAPK3をコードするポリヌクレオチドを含む適当なベクターとTER Tをコードするポリヌクレオチドを含む適当なベクターとを用いて慣用の遺伝子工学的方法でこれらを細胞にトランスフェクションすることにより達成できる。あるいは、テロメラーゼ活性が認められた細胞にMAPKAPK3をコードするポリヌクレオチドをトランスフェクションすることによっても可能である。さらに、実施例2に示したように、活性化型MAPKAPK3がTER Tと結合したことから、MAPKAPK3の代わりに、活性化型MAPKAPK3を用いて同様の同定方法を構築することも可能である。この場合、ERK、JNKおよび／またはp38をコードするポリヌクレオチドを共発現させて、細胞内でMAPKAPK3をリン酸化して活性化させることもできる。ここでシグナルとは、そのものの自体がその物理的または化学的性質により直接検出され得るものを指し、マーカーとはそのものの物理的または生物学的性質を指標として間接的に検出され得るものを指す。シグナルとして、ルシフェラーゼ、および放射性同位体等、マーカーとして、レポーター遺伝子、例えばクロラムフェニコールアセチルトランスフェラーゼ遺伝子等、または検出用のエピトープタグ、例えば6×His-tag等、公知のものが利用できる。これらシグナルまたはマーカーの検出方法は当業者には周知のものである。MAPKAPK3とTER Tの結合は、簡便には、これら蛋白質の結合の存在若しくは不存在の検出および／またはその量の変化の測定により判定可能である。これら蛋白質の結合の検出は、自体公知の蛋白質またはペプチドの検出方法、例えばウェスタンブロッティング法等を用いて実施できる。

#### 【0048】

本発明に係る同定方法は、具体的には例えば、MAPKAPK3またはTER Tの一方を固相化し、他方をシグナルで標識化して用いて結合反応を行い、標識シグナルを定量的に測定するといった当業者に知られた一般的なインビトロ（*in vitro*）における結合試験系を用いて実施できる。このような試験系に被検化合物を共存させたときの標識シグナルが、被検化合物の非共存下における標識シグナルと比較して低減するまたは消失する場合、該被検化合物はMAPKAPK3とTER Tの結合を阻害すると判定できる。



#### 【 0 0 4 0 】

本発明に係る同定方法はまた、G S T融合M A P K A P K 3またはG S T融合活性化型M A P K A P K 3とT E R Tとをインビトロで反応させて、G S Tを用いたブルダウン法により両蛋白質の結合を検出する試験系（実施例2を参照）を用いて実施可能である。このような試験系におけるM A P K A P K 3とT E R Tとの結合の検出は、T E R Tを予め標識物質で標識しておき、その標識物質を検出することにより実施できる。標識物質は、一般に蛋白質の検出に使用されている標識物質であればいずれも使用可能である。例えば、<sup>35</sup>S等の放射性同位体等が好ましく例示できる。このような試験系に被検化合物を共存させたときに検出される標識物質の量が、被検化合物の非共存下において検出される標識物質の量と比較して低減するまたは消失する場合、該被検化合物はM A P K A P K 3とT E R Tの結合を阻害すると判定できる。

#### 【 0 0 5 0 】

あるいは、本発明に係る同定方法は、動物細胞にT E R TをコードするポリヌクレオチドおよびM A P K A P K 3をコードするポリヌクレオチドをトランスフェクションして得られた細胞を用いて細胞内における結合反応を検出する試験系（実施例3を参照）を用いて実施可能である。このような試験系におけるM A P K A P K 3とT E R Tとの結合の検出は、免疫沈降法やウェスタンブロッティング等の公知方法で実施できる。このような試験系に被検化合物を共存させたとき、被検化合物の非共存下における結果と比較して、結合する蛋白質量が減少するあるいは結合が検出されなくなる場合、該被検化合物はM A P K A P K 3とT E R Tの結合を阻害すると判定できる。

#### 【 0 0 5 1 】

また、公知のツーハイブリッド（two-hybrid）法を用いることも可能である。例えば、M A P K A P K 3とD N A結合蛋白質を融合蛋白質として発現するプラスミド、T E R Tと転写活性化蛋白質を融合蛋白質として発現するプラスミド、および適切なプロモーター遺伝子に接続したlacZ等レポーター遺伝子を含むプラスミドを酵母、真核細胞等に導入し、被検化合物を共存させた場合のレポーター遺伝子の発現量を被検化合物非存在下でのレポーター遺伝子の発現量とを比較することにより達成できる。被検化合物を共存させた場合のレポーター遺伝子の発現量が被検化合物非存在下でのレポーター遺伝子の発現量と比較して減少した場合、該被検化合物はM A P K A P K 3とT E R Tとの結合を阻害する作用を有すると判定できる。

#### 【 0 0 5 2 】

ピアコアシステム（B I A C O R E system）等の表面プラズモン共鳴センサー、S P A法、あるいは蛍光共鳴エネルギー転移（Fluorescence resonance energy transfer、FRET）を応用した方法を用いて、M A P K A P K 3とT E R Tとの結合を阻害する化合物を同定することも可能である。

#### 【 0 0 5 3 】

本発明の別の態様は、活性化型M A P K A P K 3によるT E R Tのリン酸化を阻害する化合物の同定方法に関する。本化合物の同定方法は、自体公知の医薬品スクリーニングシステムを利用して実施可能である。例えば、被検化合物と活性化型M A P K A P K 3および／またはT E R Tとの相互作用を可能にする条件を選択し、当該条件下で、被検化合物と活性化型M A P K A P K 3および／またはT E R Tとを接触させ、活性化型M A P K A P K 3によるT E R Tのリン酸化を検出することができるシグナルおよび／またはマーカーを使用する系を用いて、このシグナルおよび／またはマーカーの存在若しくは不存在または変化を検出することにより、活性化型M A P K A P K 3によるT E R Tのリン酸化を阻害する化合物を同定できる。例えば活性化型M A P K A P K 3によるT E R Tのリン酸化により生じるシグナルまたは該結合のマーカーが、被検化合物を活性化型M A P K A P K 3および／またはT E R Tと接触させたときに消失あるいは低減する等の変化を示した場合、当該被検化合物は活性化型M A P K A P K 3によるT E R Tのリン酸化を阻害すると判定できる。被検化合物と活性化型M A P K A P K 3および／またはT E R Tとの相互作用を可能にする条件は、インビトロのものであってよく、インビボのものであっても

よい。例えば、活性化型MAPKAPK3を六九坑でせた細胞を用いることもできる。

#### 【0054】

本発明に係る同定方法は、具体的には例えば、テロメレース活性が確認されている細胞から調製した核抽出液を用い、脱リン酸化処理を行なった後、活性化型MAPKAPK3を添加してテロメレース活性の上昇を測定する試験系（実施例5を参照）を用いて実施できる。かかる試験系に被検化合物を共存させたときにテロメレース活性の上昇が阻害された場合、該被検化合物はTER Tのリン酸化を阻害する化合物であると判定できる。または、かかる試験系において、テロメレース活性の上昇を測定する代わりに、TER Tのリン酸化を検出することにより、TER Tのリン酸化を阻害する化合物を同定することができる。

#### 【0055】

本発明に係る同定方法はまた、上述した活性化型MAPKAPK3によるTER Tのリン酸化、およびリン酸化されたTER Tの検出を実施する方法を用いた試験系を用いて実施できる。かかる試験系に被検化合物を共存させ、該被検化合物によるTER Tのリン酸化が被検化合物の非共存下におけるリン酸化と比較して低減されるまたは消失する場合に、該被検化合物は活性化型MAPKAPK3によるTER Tのリン酸化を阻害すると判定できる。

#### 【0056】

MAPKAPK3、活性化型MAPKAPK3およびTER Tは、これらを遺伝子工学的手法で発現させた細胞、無細胞系合成産物、化学合成産物、または該細胞や生体試料から調製したものであってよく、これらからさらに精製されたものであってもよい。また、MAPKAPK3とTER Tの結合、および活性化型MAPKAPK3によるTER Tのリン酸化等の機能に影響がなければ、N末端側やC末端側に別の蛋白質やポリペプチド、例えばGST、 $\beta$ -ガラクトシダーゼ、IgG等の免疫グロブリンFc断片、His-tag、Myc-tag、HA-tag、FLAG-tag、またはXpress-tag等のtagペプチド類を、直接的にまたはリンカーペプチド等を介して間接的に、遺伝子工学的手法等を用いて付加したものであってもよい。

#### 【0057】

被検化合物は、例えば化学ライブラリーや天然物由来の化合物、または活性化型MAPKAPK3またはTER Tの一次構造や立体構造に基づいてドラッグデザインして得られた化合物等が挙げられる。あるいは、MAPKAPK3とTER Tの結合部位のアミノ酸配列からなるポリペプチドの構造に基づいてドラッグデザインして得られた化合物等も被検化合物として好適である。

#### 【0058】

また、本発明の別の一態様は、MAPKAPK3とTER Tの結合を阻害することを特徴とするテロメレース活性化阻害剤およびテロメレース活性阻害剤に関する。好ましくは、MAPKAPK3とTER Tの結合を阻害する化合物、例えば上記化合物を少なくとも1つ含んでなるテロメレース活性化阻害剤およびテロメレース活性阻害剤であることができる。

#### 【0059】

さらに、本発明の別の一態様は、活性化型MAPKAPK3によるTER Tのリン酸化を阻害することを特徴とするテロメレース活性化阻害剤およびテロメレース活性阻害剤に関する。好ましくは、活性化型MAPKAPK3によるTER Tのリン酸化を阻害する化合物、例えば上記化合物を少なくとも1つ含んでなるテロメレース活性化阻害剤およびテロメレース活性阻害剤であることができる。また、本発明の別の一態様は、上記MAPKAPK3の不活性化型変異体を含んでなるテロメレース活性阻害剤であることができる。

#### 【0060】

テロメレース活性化阻害作用およびテロメレース活性阻害作用の確認は、例えばトラップ法（TRAP法：非特許文献27）、ダイレクトテロメレースアッセイ（Direct



telomerase assay：非特許文献29）、ハイブリダイゼーションプロテクションアッセイ（Hybridization protection assay：非特許文献30）、TREアッセイ（非特許文献31）、ラビッドダイレクトテロメラーサッセイ（rapid direct telomerase assay：非特許文献32）等の方法により行うことができる。あるいは、パディソンらの方法（非特許文献33）や本明細書の実施例に具体的に記載した方法等に従って確認することも可能である。

#### 【0061】

本発明の別の一態様は、上記化合物および上記阻害剤を含む医薬組成物に関する。上記化合物および上記阻害剤は、生物学的有用性と毒性のバランスを考慮して選別することにより、医薬組成物として調製可能である。医薬組成物の調製において、これら化合物や阻害剤は、単独で使用することもできるし、複数を組み合わせて使用することも可能である。本発明に係る医薬組成物は、テロメラーゼの作用やその活性の亢進に起因する疾患の防止剤および／または治療剤、並びに当該疾患の防止方法および／または治療方法に利用可能である。テロメラーゼ活性の亢進に起因する疾患として、例えば癌疾患が挙げられる。

#### 【0062】

テロメラーゼは腫瘍の種類に関わらず大多数の腫瘍においてその活性が確認されていることから、本発明に係る医薬組成物は多様な癌細胞の増殖阻害に有効であると考えられる。したがって、本発明に係る医薬組成物を癌疾患に使用する場合、対象となる腫瘍の種類は特に限定されず、固形腫瘍または非固形腫瘍のいずれにも適用可能である。固形腫瘍または非固形腫瘍の種類も特に限定されず、テロメラーゼ活性を有するあらゆる種類の腫瘍において適用できる。例えば、胃癌、食道癌、大腸癌、小腸癌、十二指腸癌、肺癌、肝臓癌、胆嚢癌、膵臓癌、腎臓癌、膀胱癌、口腔癌、骨癌、皮膚癌、乳癌、子宮癌、前立腺癌、脳腫瘍、神経芽腫等の固形腫瘍、あるいは白血病や悪性リンパ腫等の非固形腫瘍等を挙げることができるが、本発明に係る医薬組成物の適用対象はこれら疾患に限定されない。より好ましくは、さらにMAPKAPK3の活性化やその遺伝子発現の亢進が認められる癌疾患、あるいはMAPKAPK3の活性化に関与する蛋白質の活性化が認められる癌疾患に適用できる。MAPKAPK3を活性化することが知られているp38が乳癌組織および非小細胞肺癌組織において活性化されていると報告されている。さらに、MAPKAPK3を活性化することが知られているERKが、乳癌、腎細胞癌、急性白血病、グリア性腫瘍、前立腺癌、神経上皮腫、扁平上皮癌、肝細胞癌、前立腺癌等の癌組織において活性化していると報告されている。したがって、好ましくは、乳癌、腎細胞癌、急性白血病、グリア性腫瘍、前立腺癌、神経上皮腫、扁平上皮癌、肝細胞癌、前立腺癌および非小細胞肺癌への適用が望ましく、さらに好ましくは乳癌への適用が望ましい。

#### 【0063】

本発明に係る疾患の防止剤および／または治療剤は、上記化合物および上記阻害剤のうち少なくともいずれか1つを有効成分としてその有効量含む医薬となしてもよいが、通常は、1種または2種以上の医薬用担体を用いて医薬組成物として製造することが好ましい。

#### 【0064】

本発明に係る医薬製剤中に含まれる有効成分の量は、広範囲から適宜選択される。通常約0.00001～70重量%、好ましくは0.0001～5重量%程度の範囲とするのが適当である。

#### 【0065】

医薬用担体は、製剤の使用形態に応じて通常使用される、充填剤、増量剤、結合剤、付湿剤、崩壊剤、表面活性剤、滑沢剤等の希釈剤や賦形剤等を例示できる。これらは得られる製剤の投与形態に応じて適宜選択使用される。

#### 【0066】

例えば水、医薬的に許容される有機溶剤、コラーゲン、ポリビニルアルコール、ポリビ



い。

#### 【0075】

投与経路は、全身投与または局所投与のいずれも選択することができる。この場合、疾患、症状等に応じた適当な投与経路を選択する。例えば、非経口経路として、通常の静脈内投与、動脈内投与の他、皮下、皮内、筋肉内等への投与を挙げることができる。あるいは経口による投与も可能である。さらに、経粘膜投与または経皮投与も可能である。癌疾患に用いる場合は、腫瘍に直接投与することが好ましい。

#### 【0076】

投与形態は、各種の形態が目的に応じて選択できる。その代表的なものは、錠剤、丸剤、散剤、粉末剤、細粒剤、顆粒剤、カプセル剤等の固体投与形態や、水溶液製剤、エタノール溶液製剤、懸濁剤、脂肪乳剤、リボソーム製剤、シクロデキストリン等の包接体、シロップ、エリキシル等の液剤投与形態が含まれる。これらはさらに投与経路に応じて経口剤、非経口剤（点滴剤、注射剤）、経鼻剤、吸入剤、経膈剤、坐剤、舌下剤、点眼剤、点耳剤、軟膏剤、クリーム剤、経皮吸収剤、経粘膜吸収剤等に分類され、それぞれ通常の方法に従い、調合、成形、調製することができる。

#### 【0077】

さらに本発明の一態様は、MAPKAPK3、MAPKAPK3をコードするポリヌクレオチド、該ポリヌクレオチドを含有するベクター、および該ベクターを含有する形質転換体のうちの少なくともいずれか1つと、TERT、TERTをコードするポリヌクレオチド、該ポリヌクレオチドを含有するベクター、および該ベクターを含有する形質転換体のうちの少なくともいずれか1つとを含んでなるキットに関する。当該キットは、例えば本発明に係る同定方法に使用できる。好ましくは、MAPKAPK3として活性化型MAPKAPK3を用いることができる。

#### 【0078】

ポリヌクレオチドは、例えばヒトcDNAライブラリーから自体公知の遺伝子工学的手法により調製することができる。ポリヌクレオチドを含有するベクターおよび該ベクターを含有する形質転換体は、当該ポリヌクレオチドを適当な発現ベクター、例えば細菌プラスミド由来のベクターに自体公知の遺伝子工学的手法で導入することにより、また得られたベクターを周知の方法で適当な細胞にトランスフェクションすることにより得られる。

#### 【0079】

上記キットは、MAPKAPK3または活性化型MAPKAPK3とTERTとの結合、または活性化型MAPKAPK3によるTERTのリン酸化を検出するためのシグナルおよび／またはマーカー、緩衝液、並びに塩等、必要とされる物質を含むことができる。さらに、安定化剤および／または防腐剤等の物質を含んでいてもよい。製剤化にあたっては、使用する各物質それぞれに応じた製剤化手段を導入すればよい。

#### 【0080】

以下、本発明を実施例に基づき具体的に説明するが、本発明は下記の実施例に限定されない。

#### 【実施例1】

#### 【0081】

（TERTと相互作用する機能を有する蛋白質のインシリコでの探索）

テロメレーズの触媒サブユニットであるTERTと相互作用する機能を有する蛋白質を、特許文献1に記載の予測方法に従って予測した。すなわち、TERTのアミノ酸配列のある長さのオリゴペプチドに分解し、各オリゴペプチドのアミノ酸配列あるいはそのアミノ酸配列と相同なアミノ酸配列を持った蛋白質をデータベース中で検索し、得られた蛋白質とTERTとの間でローカルアライメントを行い、ローカルアライメントのスコアの高いものをTERTと相互作用すると予測した。

解析の結果（図1）、TERTと相互作用する機能を有すると予測される蛋白質として、MAPKAPK3を見出した。

#### 【実施例2】



(TERTとMAPKAPK3のインビトロにおける結合解析)

TERTとMAPKAPK3が結合するか否かを、GST-pull down法によるインビトロ結合試験により検討した。MAPKAPK3として、MAPKAPK3、活性化型MAPKAPK3および不活性化型MAPKAPK3をそれぞれ使用した。

#### 【0083】

<材料およびその調製>

TERT発現プラスミドの構築

ヒトTERT cDNAはヒト胸腺cDNA (Clontech社製) からRT-PCRにより獲得した。ヒトTERT cDNAを動物細胞用発現ベクターpCIneo (Promega社製) へ組込むことにより、動物細胞用TERT発現プラスミドを構築した。

#### 【0084】

MAPKAPK3発現プラスミドの構築

ヒトMAPKAPK3 cDNAはヒト骨格筋cDNA (Clontech社製) からRT-PCRにより獲得した。ヒトMAPKAPK3 cDNAを、大腸菌でのGST融合蛋白質発現用ベクターであるpGEX-4T (Amersham Bioscience社製) へ組込むことにより、大腸菌用N末端GST融合MAPKAPK3発現プラスミドを構築した。

#### 【0085】

活性化型および不活性化型MAPKAPK3発現プラスミドの構築

N末端にGSTを融合させた活性化型MAPKAPK3発現プラスミドは、上記MAPKAPK3 cDNAを、MAPKAPK3のアミノ酸配列第201番目と第313番目のスレオニンがグルタミン酸に置換されるように変異を導入し、変異が導入された該cDNAを大腸菌でのGST融合蛋白質発現用ベクターであるpGEX-4Tへ組込むことにより構築した。また、N末端にGSTを融合させた不活性化型MAPKAPK3発現プラスミドは、上記MAPKAPK3 cDNAを、MAPKAPK3のアミノ酸配列第201番目と第313番目のスレオニンがアラニンに置換されるように変異を導入し、変異が導入された該cDNAを大腸菌でのGST融合蛋白質発現用ベクターであるpGEX-4Tへ組込むことにより構築した。

#### 【0086】

各プラスミドを用いた蛋白質の調製

TERTは、TNT quick coupled transcription/translation systems (Promega社製) を使用してインビトロにて35S-メチオニン標識した蛋白質として合成した。

GST融合MAPKAPK3 (GST-MAPKAPK3)、GST融合活性化型MAPKAPK3 (活性化型GST-MAPKAPK3) およびGST融合不活性化型MAPKAPK3 (不活性化型GST-MAPKAPK3) は、上記構築した各プラスミドを用いて大腸菌にトランスフェクションして発現誘導後、グルタチオンセファロースで精製して使用した。

#### 【0087】

各GST-MAPKAPK3の活性確認

それぞれ5  $\mu$ gのGST-MAPKAPK3、活性化型GST-MAPKAPK3、不活性化型GST-MAPKAPK3またはGSTと、基質として2  $\mu$ gのHSP27 (Upstate社製) とを5  $\mu$ Ciの[ $\gamma$ - $^{32}$ P]ATP (3,000 Ci/mmol、PerkinElmer社製) を含む20  $\mu$ lのリン酸化バッファー (25mM Tris-HCl、pH7.5/5mM  $\beta$ -グリセロホスフェート ( $\beta$ -glycerophosphate)/2mM ジチオスレイトール (DTT)/0.1mM  $\text{Na}_3\text{VO}_4$ /10mM  $\text{MgCl}_2$ /10  $\mu$ M ATP) 中にて、30℃で15分間インキュベーションすることによりリン酸化反応を行った。反応後、20  $\mu$ lの2XSDS サンプルバ



ロール／0.01%　ブロムフェノールブルー（BPB）／10%　β-メルカプトエタノール〕を加え、100℃で5分間処理した後、5-20%　SDS-PAGEにより蛋白質を分離し、BAS2000（Fuji film社製）を用いたオートラジオグラフィーによりリン酸化されたHSP27を検出した。

#### 【0088】

##### <方法>

GST-pull down法による結合試験

TERT合成反応液の20μlとGST-MAPKAPK3、活性化型GST-MAPKAPK3または不活性化型GST-MAPKAPK3の5μgとを、500μlのバインディングバッファー（20mM Tris-HCl, pH8.0／140mM NaCl／1mM エチレンジグリコールビス四酢酸（EGTA）／1mM ジチオスレイトール（DTT）／1% TritonX-100／10% グリセロール）中にて、氷上、1時間静置した。その後、20μlのグルタチオンセファロース4B（Glutathione sepharose 4B）を添加し、4℃にて一晩、転倒混和した後、遠心処理によりセファロースビーズを回収した。セファロースビーズを500μlのバインディングバッファーで4回洗浄した後、20μlの2×SDS サンプルバッファー（125mM Tris-HCl, pH6.8／4% SDS／20% グリセロール／0.01% ブロムフェノールブルー）を加え、3分間煮沸後、上清を5-20% SDS-PAGEにより分離した。その後、FLA3000（Fuji film社製）によりTERTを検出した。陰性コントロールとして、各MAPKAPK3の代わりにGSTを用い、上記同様の処理を行なった。また、SDS-PAGEによるTERT検出のコントロールとして、<sup>35</sup>S-メチオニン標識したTERTを用いた。

#### 【0089】

##### <結果>

MAPKAPK3、活性化型GST-MAPKAPK3および不活性化型GST-MAPKAPK3のいずれのGST-MAPKAPK3においてもTERTとの結合が認められた（図2）。GSTとTERTとの結合は認められなかったことから、検出されたTERTと各GST-MAPKAPK3との結合は特異的であると言える（図2）。これらから、MAPKAPK3、活性化型GST-MAPKAPK3および不活性化型GST-MAPKAPK3はいずれも、TERTと直接結合することが明らかになった。

#### 【実施例3】

#### 【0090】

##### （TERTとMAPKAPK3の結合解析）

TERTとMAPKAPK3が結合するか否かを、細胞内共発現／免疫共沈降法による結合試験により検討した。

#### 【0091】

##### <材料>

MAPKAPK3発現プラスミドの構築

ヒトMAPKAPK3 cDNAはRT-PCRにより獲得し、動物細胞用発現ベクターpcDNA3.1（+）（Invitrogen社製）へ組込んだ。その際、5'側にHA-tagコード配列を挿入し、動物細胞用N末端HA-tag付加型MAPKAPK3発現プラスミドを構築した。

#### 【0092】

TERT発現プラスミドは、実施例2で作製したプラスミドを用いた。

#### 【0093】

##### <方法>

トランスフェクションおよび免疫共沈降法による結合試験

細胞数 $4 \times 10^5$ のHEK293T細胞を5%CO<sub>2</sub>存在下にて37℃で一晩培養した後（直径60mmシャーレ）、2μgのHA-tag付加型MAPKAPK3発現プラス

ミドまたは陰性コントロールとして p c D N A 3 . 1 ( + ) を 2 μ g の l i p i d 1 9 6 ノノ  
スミドと共に、F u G E N E 6 T r a n s f e c t i o n R e a g e n t ( R o c h  
e 社製)を用いてトランスフェクションした。2日間培養後、細胞を氷冷したリン酸緩衝  
生理食塩水 ( P B S ( - ) ) で洗浄して回収後、500 μ l の細胞溶解バッファー ( 20  
mM T r i s - H C l 、 p H 7 . 4 / 150 mM N a C l / 1 mM エチレンジアミ  
ン四酢酸 ( E D T A ) / 1 mM E G T A / 1 % T r i t o n X - 100 / 2 . 5 m  
M ビロホスフェートナトリウム ( s o d i u m p y r o p h o s p h a t e ) / 1 m  
M β - グリセロホスフェート / 1 mM N a <sub>3</sub> V O <sub>4</sub> / プロテアーゼ阻害剤カクテル (   
p r o t e a s e i n h i b i t o r c o c k t a i l ) ) に懸濁し、氷上で10分  
間放置した。その後、4℃、14,000 rpmで10分間の遠心処理により上清を回収  
し、細胞溶解液とした。次に、500 μ l の細胞溶解液に10 μ l のアガロース結合正常  
ウサギ I g G ( A g a r o s e - c o n j u g a t e d n o r m a l r a b b i t  
I g G 、 S i g m a 社製)を加え、4℃にて30分間転倒混和した後、遠心処理により上  
清を回収した。回収した上清に10 μ l のアガロース結合抗HA抗体 ( Y - 11、S a n  
t a C r u z 社製)を加え、4℃にて一晩転倒混和した後、遠心処理によりアガロースビ  
ーズを回収した。アガロースビーズを500 μ l の細胞溶解バッファーで4回洗浄した後  
、25 μ l の2×SDS サンプルバッファーを加え、5分間加熱後、上清を5-20%  
SDS-PAGEにより分離した。その後、抗TERT抗体 ( L - 20、S a n t a C  
r u z 社製)を用いたウェスタンブロッティングにより結合蛋白質を検出した。なお、検  
出はECL western blotting detection kit ( A m e  
r s h a m b i o s c i e n c e s 社製)を使用して行なった。

#### 【0094】

##### <結果>

TERTとHA-t a g 付加型MAPKAPK3 ( HA-MAPKAPK3 ) を共発現  
させた細胞の細胞溶解液 ( 図3のレーン2 ) について、抗HA抗体で免疫沈降後に抗TERT  
抗体で蛋白質の検出を行なった。その結果、HA-MAPKAPK3の共沈降が認め  
られた ( 図3の最下段のパネル ) 。このことから、TERTとMAPKAPK3が結合す  
ることが明らかになった。

#### 【実施例4】

#### 【0095】

( MAPKAPK3一過性発現による細胞内テロメラーゼ活性の上昇 )

テロメラーゼ陽性細胞であるHEK293T細胞へのMAPKAPK3の一過性発現に  
より細胞内テロメラーゼ活性が変動するか否かについて検討した。

#### 【0096】

##### <材料>

MAPKAPK3発現プラスミドは、実施例3で構築した動物細胞用N末端HA-t a  
g 付加型MAPKAPK3発現プラスミドを用いた。このHA-t a g 付加型MAPKA  
PK3発現プラスミドを基に、MAPKAPK3のアミノ酸配列第201番目と第313  
番目のスレオニンがグルタミン酸に置換されるように変異を導入することにより、N末端  
にHA-t a g が付加された活性化型MAPKAPK3発現プラスミドを構築した。また  
、N末端にHA-t a g が付加された不活性化型MAPKAPK3発現プラスミドを、上  
記HA-t a g 付加型MAPKAPK3発現プラスミドを基に、MAPKAPK3のアミ  
ノ酸配列第201番目と第313番目のスレオニンがアラニンに置換されるように変異を  
導入することにより構築した。また、陰性コントロールとしてp c D N A 3 . 1 ( + ) を  
使用した。

#### 【0097】

##### <方法>

トランスフェクションおよびTRAP法による細胞内テロメラーゼ活性の測定

細胞数  $2 \times 10^4$  のHEK293T細胞を5%CO<sub>2</sub>存在下にて37℃で一晩培養した  
後 ( 24 w e l l プレート ) 、0 . 2 μ g の各発現プラスミドをF u G E N E 6 T r a





また、不活性化型MAPKAPK3を一過性発現させた場合は細胞内テロメラーゼ活性の低減が認められた（約0.7倍）ことから、不活性化型MAPKAPK3がテロメラーゼ活性に対するドミナントネガティブ効果を有する可能性が考えられた。また、一過性発現させた各MAPKAPK3のキナーゼ活性をHSP27を基質として確認した結果、活性化型MAPKAPK3においてのみ活性が認められた。

#### 【0101】

以上の結果から、HEK293T細胞のテロメラーゼ活性が活性化型MAPKAPK3の一過性発現により促進され、この効果はMAPKAPK3のキナーゼ活性に依存することが明らかになった。

#### 【実施例5】

#### 【0102】

（MAPKAPK3によるテロメラーゼ活性の上昇／HEK293細胞核抽出液を用いたインビトロ系での検討）

細胞抽出液を脱リン酸化処理することにより抽出液中のテロメラーゼ活性が低減することが報告されていることから、テロメラーゼの活性化におけるリン酸化の必要性が示唆されている。そこで、HEK293細胞核抽出液を用いて核抽出液中のテロメラーゼ活性に対する脱リン酸化処理の影響と、HEK293細胞核抽出液中のテロメラーゼ活性が、精製したMAPKAPK3との反応により変化するか否かについて検討した。

#### 【0103】

<材料>

MAPKAPK3の調製と活性確認

GST-MAPKAPK3、活性化型GST-MAPKAPK3および不活性化型GST-MAPKAPK3は、実施例2に記載の方法と同様の方法で調製した。また、各MAPKAPK3の活性は、実施例2に記載の方法で確認した。

#### 【0104】

HEK293細胞核抽出液の調整

HEK293細胞を400μLのバッファーA（10mM HEPES-KOH、pH8.0／10mM KCl／0.1mM EDTA／0.1mM EGTA／1mM DTT／プロテアーゼ阻害剤カクテル）に懸濁し、氷上で15分間放置後、25μLの10% ノニデット P-40を加えてさらに氷上で10分間放置した。その後、4℃で14,000rpm, 5分間の遠心処理により沈降した核を回収した。沈殿した核に100μLのバッファーC（20mM HEPES-KOH、pH8.0／400mM NaCl／1mM EDTA／1mM EGTA／1mM DTT／プロテアーゼ阻害剤カクテル）を加えてよく攪拌し、氷上で15分放置後、4℃で14,000rpm, 5分間の遠心処理により上清を回収し、核抽出液とした。その後、回収した核抽出液にバッファーD（20mM HEPES-KOH、pH8.0／0.2mM EDTA）を加え、核抽出液中のNaClの最終濃度を150mMにした。核抽出液は使用時まで-80℃で保存した。

#### 【0105】

HEK293細胞核抽出液の脱リン酸化処理および核抽出液内テロメラーゼ活性の測定

蛋白質量2000ngのHEK293細胞核抽出液に500、100、20、4、0.8、0.0、unitのホスファターゼ、アルカリーアガロース（CIP-Agarose、Sigma社製）を加え、20μLの反応系（50mM Tris-HCl、pH8.0／1mM MgCl<sub>2</sub>）にて30℃で30分間脱リン酸化反応を行った。その後、遠心処理上清1μLを上記反応バッファーで20μLに希釈し、そのうち1μLを用いてTRAP反応を行い、テロメラーゼ活性を測定した。

#### 【0106】

HEK293細胞核抽出液中のテロメラーゼ活性に対するMAPKAPK3の影響についての検討

上記と同様の方法でHEK293細胞核抽出液を脱リン酸化処理後、遠心処理上清1μ



1に100、50、25、12.5、0.25 pmolの活性化型GST-MAPKAPK3またはGSTを加え、20  $\mu$ lの反応系(25mM Tris-HCl、pH7.5 / 5mM  $\beta$ -グリセロホスフェート / 2mM DTT / 0.1mM  $\text{Na}_3\text{VO}_4$  / 10mM  $\text{MgCl}_2$  / 0.1mM ATP)にて30°Cで30分間リン酸化反応を行った。MAPKAPK3の各変異体の影響について検討する場合は、各変異型蛋白質を100 pmol使用し、リン酸化反応を行った。その後、反応液1  $\mu$ lを用いてTRAP反応を行い、テロメラーゼ活性を測定した。

#### 【0107】

##### <結果>

脱リン酸化処理により、脱リン酸化酵素の用量依存的にテロメラーゼ活性の低減が認められた(図5)。すなわち、HEK293細胞核抽出液中のテロメラーゼがリン酸化依存的に活性化されていることが確認された。

#### 【0108】

脱リン酸化処理によりテロメラーゼ活性が低減した核抽出液に活性化型MAPKAPK3を添加してリン酸化反応を行なった。その結果、活性化型MAPKAPK3用量依存的にテロメラーゼ活性が上昇した(最大約1.5倍、図6)。GSTを添加して同様にリン酸化反応を行なった場合は、テロメラーゼ活性の上昇は認められなかった。また、MAPKAPKまたは不活性化型の各MAPKAPK3を添加して同様にリン酸化反応を行なった場合は、テロメラーゼ活性の変化は認められなかった(図7)。精製した各MAPKAPK3のキナーゼ活性をHSP27を用いたリン酸化試験で確認した結果、活性化型MAPKAPK3においてのみ活性が認められた。

#### 【0109】

これらから、インビトロにおいてもMAPKAPK3がそのキナーゼ活性依存的にテロメラーゼ活性を上昇させることが明らかになった。

#### 【産業上の利用可能性】

#### 【0110】

本発明によれば、テロメラーゼの活性化またはテロメラーゼの活性を阻害する化合物の同定方法の提供が可能である。また、本発明によれば、テロメラーゼの活性化またはテロメラーゼの活性の阻害が可能である。さらに、テロメラーゼの作用やその活性の亢進に起因する疾患の防止および／または治療が可能である。テロメラーゼが癌の種類を問わずほとんどの癌細胞で発現しており、生殖細胞以外の正常体細胞ではほとんど発現していないことから、本発明は例えば、多様な癌疾患の防止および／または治療に有効であると考えられる。

#### 【0111】

このように本発明は、テロメラーゼが関与する細胞増殖や細胞老化のメカニズムおよびテロメラーゼの作用やその活性の亢進に起因する疾患等に関する基礎的研究等に有用である。さらにテロメラーゼの作用やその活性の亢進に起因する疾患、例えば癌疾患の防止および／または治療に非常に有用である。

#### 【図面の簡単な説明】

#### 【0112】

【図1】テロメラーゼの触媒サブユニットであるTERTとMAPKAPK3の相互作用をインシリコで予測した結果を示す図である。TERTとMAPKAPK3の間でローカルアライメントを行い、高いスコア(score)を示した領域を図示した。アミノ酸配列は1文字表記した。図中の数字は、TERTまたはMAPKAPK3の各アミノ酸配列における、図示した各領域のN末端アミノ酸の位置を意味する。(実施例1)

【図2】MAPKAPK3または活性化型MAPKAPK3と $^{35}\text{S}$ -メチオニン標識蛋白質として合成したTERTとが結合することを、グルタチオンセファロースを用いたプルダウン法により検出した結果を示す図である。また、不活性化型MAPKAPK3も、MAPKAPK3または活性化型MAPKAPK3と比較して弱い結合

のであるが、1と1は1と和ロした。この1は1と1は1と和ロしなかった。入頭は、1  
E R Tの位置を示す。（実施例2）

【図3】T E R TとH A-M A P K A P K 3を共発現させた細胞の細胞溶解液（レーン2）について、抗H A抗体で免疫沈降（I P）後に抗T E R T抗体を用いたウェスタンブロッティング（W B）で蛋白質の検出を行なったところ、H A-M A P K A P K 3の共沈降が認められた（最下段のパネル）ことを示す図である。レーン1は、H A-M A P K A P K 3の代わりに空ベクターを導入した細胞の細胞溶解液についての結果を示す。（実施例3）

【図4】テロメラーゼ活性を有する細胞に活性化型M A P K A P K 3を一過性発現させた場合は細胞内テロメラーゼ活性の上昇が認められたことを示す図である。一方、不活性化型M A P K A P K 3を一過性発現させた場合は、細胞内テロメラーゼ活性の低下が認められた。図中、「\*\*」はスチューデント t-テストで有意差（ $p < 0.01$ ）が認められたことを示す。（実施例4）

【図5】脱リン酸化処理により、脱リン酸化酵素の用量依存的にテロメラーゼ活性が低減したことを示す図である。（実施例5）

【図6】脱リン酸化処理によりテロメラーゼ活性が低減した核抽出液に活性化型M A P K A P K 3を添加してリン酸化反応を行なったところ、活性化型M A P K A P K 3用量依存的にテロメラーゼ活性が上昇したことを示す図である。G S Tを添加して同様にリン酸化反応を行なった場合は、テロメラーゼ活性の上昇は認められなかった。図中、「C I P」とは、脱リン酸化酵素を意味する。（実施例5）

【図7】脱リン酸化処理によりテロメラーゼ活性が低減した核抽出液に活性化型M A P K A P K 3を添加してリン酸化反応を行なったところテロメラーゼ活性が上昇したが、M A P K A P K 3または不活性化型M A P K A P K 3によってはテロメラーゼ活性の上昇が認められなかったことを示す図である。（実施例5）

#### 【配列表フリーテキスト】

##### 【0113】

配列番号5：M A P K A P K 3（配列番号2）の第201番目および第313番目のアミノ酸残基が共にスレオニンからアラニンに置換した不活性化型変異体をコードするポリヌクレオチド。

配列番号6：M A P K A P K 3（配列番号2）の第201番目および第313番目のアミノ酸残基が共にスレオニンからアラニンに置換した不活性化型変異体。

配列番号7：M A P K A P K 3（配列番号2）の第201番目および第313番目のアミノ酸残基が共にスレオニンからグルタミン酸に置換した活性化型変異体をコードするポリヌクレオチド。

配列番号8：M A P K A P K 3（配列番号2）の第201番目および第313番目のアミノ酸残基が共にスレオニンからグルタミン酸に置換した活性化型変異体。

配列番号9：M A P K A P K 3（配列番号2）の部分配列と高い相同性を有する、T E R T（配列番号4）の部分配列。

配列番号10：T E R T（配列番号4）の部分配列と高い相同性を有する、M A P K A P K 3（配列番号2）の部分配列。

配列番号11：M A P K A P K 3（配列番号2）の部分配列と高い相同性を有する、T E R T（配列番号4）の部分配列。

配列番号12：T E R T（配列番号4）の部分配列と高い相同性を有する、M A P K A P K 3（配列番号2）の部分配列。

配列番号13：T E R T（配列番号4）およびM A P K A P K 3（配列番号2）の配列において、同一の部分配列。

## SEQUENCE LISTING

<110> DAIICHI PHARMACEUTICAL CO., LTD.  
CELESTAR LEXICO-SCIENCES, INC.

<120> A method for inhibiting telomerase activity and an agent for inhibiting the same

<130> NP03-1177

<160> 13

<170> PatentIn version 3.1

<210> 1

<211> 1149

<212> DNA

<213> Homo sapiens

<220>

<221> CDS

<222> (1)..(1149)

<223>

<400> 1

atg	gat	ggt	gaa	aca	gca	gag	gag	cag	ggg	ggc	cct	gtg	ccc	ccg	cca	48
Met	Asp	Gly	Glu	Thr	Ala	Glu	Glu	Gln	Gly	Gly	Pro	Val	Pro	Pro	Pro	
1				5					10					15		

gtt	gca	ccc	ggc	gga	ccc	ggc	ttg	ggc	ggt	gct	ccg	ggg	ggg	cgg	cgg	96
Val	Ala	Pro	Gly	Gly	Pro	Gly	Leu	Gly	Gly	Ala	Pro	Gly	Gly	Arg	Arg	
			20					25					30			

gag	ccc	aag	aag	tac	gca	gtg	acc	gac	gac	tac	cag	ttg	tcc	aag	cag	144
Glu	Pro	Lys	Lys	Tyr	Ala	Val	Thr	Asp	Asp	Tyr	Gln	Leu	Ser	Lys	Gln	
		35					40					45				

gtg	ctg	ggc	ctg	ggt	gtg	aac	ggc	aaa	gtg	ctg	gag	tgc	ttc	cat	cgg	192
Val	Leu	Gly	Leu	Gly	Val	Asn	Gly	Lys	Val	Leu	Glu	Cys	Phe	His	Arg	
	50					55					60					

cgc	act	gga	cag	aag	tgt	gcc	ctg	aag	ctc	ctg	tat	gac	agc	ccc	aag	240
Arg	Thr	Gly	Gln	Lys	Cys	Ala	Leu	Lys	Leu	Leu	Tyr	Asp	Ser	Pro	Lys	
65					70				75						80	

gcc	cgg	cag	gag	gta	gac	cat	cac	tgg	cag	gct	tct	ggc	ggc	ccc	cat	288
Ala	Arg	Gln	Glu	Val	Asp	His	His	Trp	Gln	Ala	Ser	Gly	Gly	Pro	His	
				85					90					95		



att gtc tgc att ctg gat gtc tat gag aac atg cac cat ggc aag tgc	550
Ile Val Cys Ile Leu Asp Val Tyr Glu Asn Met His His Gly Lys Arg	
100 105 110	
tgt ctc ctc atc atc atg gaa tgc atg gaa ggt ggt gag ttg ttc agc	384
Cys Leu Leu Ile Ile Met Glu Cys Met Glu Gly Gly Glu Leu Phe Ser	
115 120 125	
agg att cag gag cgt ggc gac cag gct ttc act gag aga gaa gct gca	432
Arg Ile Gln Glu Arg Gly Asp Gln Ala Phe Thr Glu Arg Glu Ala Ala	
130 135 140	
gag ata atg cgg gat att ggc act gcc atc cag ttt ctg cac agc cat	480
Glu Ile Met Arg Asp Ile Gly Thr Ala Ile Gln Phe Leu His Ser His	
145 150 155 160	
aac att gcc cac cga gat gtc aag cct gaa aac cta ctc tac aca tct	528
Asn Ile Ala His Arg Asp Val Lys Pro Glu Asn Leu Leu Tyr Thr Ser	
165 170 175	
aag gag aaa gac gca gtg ctt aag ctc acc gat ttt ggc ttt gct aag	576
Lys Glu Lys Asp Ala Val Leu Lys Leu Thr Asp Phe Gly Phe Ala Lys	
180 185 190	
gag acc acc caa aat gcc ctg cag aca ccc tgc tat act ccc tat tat	624
Glu Thr Thr Gln Asn Ala Leu Gln Thr Pro Cys Tyr Thr Pro Tyr Tyr	
195 200 205	
gtg gcc cct gag gtc ctg ggt cca gag aag tat gac aag tca tgt gac	672
Val Ala Pro Glu Val Leu Gly Pro Glu Lys Tyr Asp Lys Ser Cys Asp	
210 215 220	
atg tgg tcc ctg ggt gtc atc atg tac atc ctc ctt tgt ggc ttc cca	720
Met Trp Ser Leu Gly Val Ile Met Tyr Ile Leu Leu Cys Gly Phe Pro	
225 230 235 240	
ccc ttc tac tcc aac acg ggc cag gcc atc tcc ccg ggg atg aag agg	768
Pro Phe Tyr Ser Asn Thr Gly Gln Ala Ile Ser Pro Gly Met Lys Arg	
245 250 255	
agg att cgc ctg ggc cag tac ggc ttc ccc aat cct gag tgg tca gaa	816
Arg Ile Arg Leu Gly Gln Tyr Gly Phe Pro Asn Pro Glu Trp Ser Glu	
260 265 270	
gtc tct gag gat gcc aag cag ctg atc cgc ctc ctg ttg aag aca gac	864
Val Ser Glu Asp Ala Lys Gln Leu Ile Arg Leu Leu Leu Lys Thr Asp	
275 280 285	
ccc aca gag agg ctg acc atc act cag ttc atg aac cac ccc tgg atc	912
Pro Thr Glu Arg Leu Thr Ile Thr Gln Phe Met Asn His Pro Trp Ile	

290

290

300

aac caa tcg atg gta gtg cca cag acc cca ctc cac acg gcc cga gtg 960  
 Asn Gln Ser Met Val Val Pro Gln Thr Pro Leu His Thr Ala Arg Val  
 305 310 315 320

ctg cag gag gac aaa gac cac tgg gac gaa gtc aag gag gag atg acc 1008  
 Leu Gln Glu Asp Lys Asp His Trp Asp Glu Val Lys Glu Glu Met Thr  
 325 330 335

agt gcc ttg gcc act atg cgg gta gac tac gac cag gtg aag atc aag 1056  
 Ser Ala Leu Ala Thr Met Arg Val Asp Tyr Asp Gln Val Lys Ile Lys  
 340 345 350

gac ctg aag acc tct aac aac cgg ctc ctc aac aag agg aga aaa aag 1104  
 Asp Leu Lys Thr Ser Asn Asn Arg Leu Leu Asn Lys Arg Arg Lys Lys  
 355 360 365

cag gca ggc agc tcc tct gcc tca cag ggc tgc aac aac cag tag 1149  
 Gln Ala Gly Ser Ser Ser Ala Ser Gln Gly Cys Asn Asn Gln  
 370 375 380

<210> 2  
 <211> 382  
 <212> PRT  
 <213> Homo sapiens

<400> 2

Met Asp Gly Glu Thr Ala Glu Glu Gln Gly Gly Pro Val Pro Pro Pro  
 1 5 10 15

Val Ala Pro Gly Gly Pro Gly Leu Gly Gly Ala Pro Gly Gly Arg Arg  
 20 25 30

Glu Pro Lys Lys Tyr Ala Val Thr Asp Asp Tyr Gln Leu Ser Lys Gln  
 35 40 45

Val Leu Gly Leu Gly Val Asn Gly Lys Val Leu Glu Cys Phe His Arg  
 50 55 60

Arg Thr Gly Gln Lys Cys Ala Leu Lys Leu Leu Tyr Asp Ser Pro Lys  
 65 70 75 80

Ala Arg Gln Glu Val Asp His His Ile Gln Ala Ser Gly Gly Ile His  
85 90 95

Ile Val Cys Ile Leu Asp Val Tyr Glu Asn Met His His Gly Lys Arg  
100 105 110

Cys Leu Leu Ile Ile Met Glu Cys Met Glu Gly Gly Glu Leu Phe Ser  
115 120 125

Arg Ile Gln Glu Arg Gly Asp Gln Ala Phe Thr Glu Arg Glu Ala Ala  
130 135 140

Glu Ile Met Arg Asp Ile Gly Thr Ala Ile Gln Phe Leu His Ser His  
145 150 155 160

Asn Ile Ala His Arg Asp Val Lys Pro Glu Asn Leu Leu Tyr Thr Ser  
165 170 175

Lys Glu Lys Asp Ala Val Leu Lys Leu Thr Asp Phe Gly Phe Ala Lys  
180 185 190

Glu Thr Thr Gln Asn Ala Leu Gln Thr Pro Cys Tyr Thr Pro Tyr Tyr  
195 200 205

Val Ala Pro Glu Val Leu Gly Pro Glu Lys Tyr Asp Lys Ser Cys Asp  
210 215 220

Met Trp Ser Leu Gly Val Ile Met Tyr Ile Leu Leu Cys Gly Phe Pro  
225 230 235 240

Pro Phe Tyr Ser Asn Thr Gly Gln Ala Ile Ser Pro Gly Met Lys Arg  
245 250 255

Arg Ile Arg Leu Gly Gln Tyr Gly Phe Pro Asn Pro Glu Trp Ser Glu  
260 265 270

Val Ser Glu Asp Ala Lys Gln Leu Ile Arg Leu Leu Leu Lys Thr Asp  
275 280 285



Pro Thr Glu Arg Leu Thr Ile Thr Gln Phe Met Asn His Pro Trp Ile  
 290 295 300

Asn Gln Ser Met Val Val Pro Gln Thr Pro Leu His Thr Ala Arg Val  
 305 310 315 320

Leu Gln Glu Asp Lys Asp His Trp Asp Glu Val Lys Glu Glu Met Thr  
 325 330 335

Ser Ala Leu Ala Thr Met Arg Val Asp Tyr Asp Gln Val Lys Ile Lys  
 340 345 350

Asp Leu Lys Thr Ser Asn Asn Arg Leu Leu Asn Lys Arg Arg Lys Lys  
 355 360 365

Gln Ala Gly Ser Ser Ser Ala Ser Gln Gly Cys Asn Asn Gln  
 370 375 380

<210> 3  
 <211> 3399  
 <212> DNA  
 <213> Homo sapiens

<220>  
 <221> CDS  
 <222> (1)..(3399)  
 <223>

<400> 3  
 atg ccg cgc gct ccc cgc tgc cga gcc gtg cgc tcc ctg ctg cgc agc 48  
 Met Pro Arg Ala Pro Arg Cys Arg Ala Val Arg Ser Leu Leu Arg Ser  
 1 5 10 15

cac tac cgc gag gtg ctg ccg ctg gcc acg ttc gtg cgg cgc ctg ggg 96  
 His Tyr Arg Glu Val Leu Pro Leu Ala Thr Phe Val Arg Arg Leu Gly  
 20 25 30

ccc cag ggc tgg cgg ctg gtg cag cgc ggg gac ccg gcg gct ttc cgc 144  
 Pro Gln Gly Trp Arg Leu Val Gln Arg Gly Asp Pro Ala Ala Phe Arg  
 35 40 45

gcg ctg gtg gcc cag tgc ctg gtg tgc gtg ccc tgg gac gca cgg ccg 192

Ala	Leu	Val	Ala	Gln	Cys	Leu	Val	Cys	Val	Ile	Ile	Asp	Ala	Arg	Ile	
50						55					60					
ccc	ccc	gcc	gcc	ccc	tcc	ttc	cgc	cag	gtg	tcc	tgc	ctg	aag	gag	ctg	240
Pro	Pro	Ala	Ala	Pro	Ser	Phe	Arg	Gln	Val	Ser	Cys	Leu	Lys	Glu	Leu	
65					70				75						80	
gtg	gcc	cga	gtg	ctg	cag	agg	ctg	tgc	gag	cgc	ggc	gcg	aag	aac	gtg	288
Val	Ala	Arg	Val	Leu	Gln	Arg	Leu	Cys	Glu	Arg	Gly	Ala	Lys	Asn	Val	
				85					90					95		
ctg	gcc	ttc	ggc	ttc	gcg	ctg	ctg	gac	ggg	gcc	cgc	ggg	ggc	ccc	ccc	336
Leu	Ala	Phe	Gly	Phe	Ala	Leu	Leu	Asp	Gly	Ala	Arg	Gly	Gly	Pro	Pro	
			100					105					110			
gag	gcc	ttc	acc	acc	agc	gtg	cgc	agc	tac	ctg	ccc	aac	acg	gtg	acc	384
Glu	Ala	Phe	Thr	Thr	Ser	Val	Arg	Ser	Tyr	Leu	Pro	Asn	Thr	Val	Thr	
		115					120					125				
gac	gca	ctg	cgg	ggg	agc	ggg	gcg	tgg	ggg	ctg	ctg	ctg	cgc	cgc	gtg	432
Asp	Ala	Leu	Arg	Gly	Ser	Gly	Ala	Trp	Gly	Leu	Leu	Leu	Arg	Arg	Val	
	130					135					140					
ggc	gac	gac	gtg	ctg	gtt	cac	ctg	ctg	gca	cgc	tgc	gcg	ctc	ttt	gtg	480
Gly	Asp	Asp	Val	Leu	Val	His	Leu	Leu	Ala	Arg	Cys	Ala	Leu	Phe	Val	
145					150					155					160	
ctg	gtg	gct	ccc	agc	tgc	gcc	tac	cag	gtg	tgc	ggg	ccg	ccg	ctg	tac	528
Leu	Val	Ala	Pro	Ser	Cys	Ala	Tyr	Gln	Val	Cys	Gly	Pro	Pro	Leu	Tyr	
				165					170					175		
cag	ctc	ggc	gct	gcc	act	cag	gcc	cgg	ccc	ccg	cca	cac	gct	agt	gga	576
Gln	Leu	Gly	Ala	Ala	Thr	Gln	Ala	Arg	Pro	Pro	Pro	His	Ala	Ser	Gly	
			180					185					190			
ccc	cga	agg	cgt	ctg	gga	tgc	gaa	cgg	gcc	tgg	aac	cat	agc	gtc	agg	624
Pro	Arg	Arg	Arg	Leu	Gly	Cys	Glu	Arg	Ala	Trp	Asn	His	Ser	Val	Arg	
		195					200					205				
gag	gcc	ggg	gtc	ccc	ctg	ggc	ctg	cca	gcc	ccg	ggg	gcg	agg	agg	cgc	672
Glu	Ala	Gly	Val	Pro	Leu	Gly	Leu	Pro	Ala	Pro	Gly	Ala	Arg	Arg	Arg	
	210					215					220					
ggg	ggc	agt	gcc	agc	cga	agt	ctg	ccg	ttg	ccc	aag	agg	ccc	agg	cgt	720
Gly	Gly	Ser	Ala	Ser	Arg	Ser	Leu	Pro	Leu	Pro	Lys	Arg	Pro	Arg	Arg	
225					230					235					240	
ggc	gct	gcc	cct	gag	ccg	gag	cgg	acg	ccc	gtt	ggg	cag	ggg	tcc	tgg	768
Gly	Ala	Ala	Pro	Glu	Pro	Glu	Arg	Thr	Pro	Val	Gly	Gln	Gly	Ser	Trp	
				245					250						255	

gcc cac ccg ggc agg acg cgt gga ccg agt gac cgt ggt ttc tgt gtg	816
Ala His Pro Gly Arg Thr Arg Gly Pro Ser Asp Arg Gly Phe Cys Val	
260 265 270	
gtg tca cct gcc aga ccc gcc gaa gaa gcc acc tct ttg gag ggt gcg	864
Val Ser Pro Ala Arg Pro Ala Glu Glu Ala Thr Ser Leu Glu Gly Ala	
275 280 285	
ctc tct ggc acg cgc cac tcc cac cca tcc gtg ggc cgc cag cac cac	912
Leu Ser Gly Thr Arg His Ser His Pro Ser Val Gly Arg Gln His His	
290 295 300	
gcg ggc ccc cca tcc aca tcg cgg cca cca cgt ccc tgg gac acg cct	960
Ala Gly Pro Pro Ser Thr Ser Arg Pro Pro Arg Pro Trp Asp Thr Pro	
305 310 315 320	
tgt ccc ccg gtg tac gcc gag acc aag cac ttc ctc tac tcc tca ggc	1008
Cys Pro Pro Val Tyr Ala Glu Thr Lys His Phe Leu Tyr Ser Ser Gly	
325 330 335	
gac aag gag cag ctg cgg ccc tcc ttc cta ctc agc tct ctg agg ccc	1056
Asp Lys Glu Gln Leu Arg Pro Ser Phe Leu Leu Ser Ser Leu Arg Pro	
340 345 350	
agc ctg act ggc gct cgg agg ctc gtg gag acc atc ttt ctg ggt tcc	1104
Ser Leu Thr Gly Ala Arg Arg Leu Val Glu Thr Ile Phe Leu Gly Ser	
355 360 365	
agg ccc tgg atg cca ggg act ccc cgc agg ttg ccc cgc ctg ccc cag	1152
Arg Pro Trp Met Pro Gly Thr Pro Arg Arg Leu Pro Arg Leu Pro Gln	
370 375 380	
cgc tac tgg caa atg cgg ccc ctg ttt ctg gag ctg ctt ggg aac cac	1200
Arg Tyr Trp Gln Met Arg Pro Leu Phe Leu Glu Leu Leu Gly Asn His	
385 390 395 400	
gcg cag tgc ccc tac ggg gtg ctc ctc aag acg cac tgc ccg ctg cga	1248
Ala Gln Cys Pro Tyr Gly Val Leu Leu Lys Thr His Cys Pro Leu Arg	
405 410 415	
gct gcg gtc acc cca gca gcc ggt gtc tgt gcc cgg gag aag ccc cag	1296
Ala Ala Val Thr Pro Ala Ala Gly Val Cys Ala Arg Glu Lys Pro Gln	
420 425 430	
ggc tct gtg gcg gcc ccc gag gag gag gac aca gac ccc cgt cgc ctg	1344
Gly Ser Val Ala Ala Pro Glu Glu Glu Asp Thr Asp Pro Arg Arg Leu	
435 440 445	
gtg cag ctg ctc cgc cag cac agc agc ccc tgg cag gtg tac ggc ttc	1392



Val	Gln	Leu	Leu	Arg	Gln	Phe	Ser	Ser	Pro	Pro	Gln	Val	Tyr	Gly	Ile	
450						455					460					
gtg	cgg	gcc	tgc	ctg	cgc	cgg	ctg	gtg	ccc	cca	ggc	ctc	tgg	ggc	tcc	1440
Val	Arg	Ala	Cys	Leu	Arg	Arg	Leu	Val	Pro	Pro	Gly	Leu	Trp	Gly	Ser	
465					470				475						480	
agg	cac	aac	gaa	cgc	cgc	ttc	ctc	agg	aac	acc	aag	aag	ttc	atc	tcc	1488
Arg	His	Asn	Glu	Arg	Arg	Phe	Leu	Arg	Asn	Thr	Lys	Lys	Phe	Ile	Ser	
				485					490						495	
ctg	ggg	aag	cat	gcc	aag	ctc	tgc	ctg	cag	gag	ctg	acg	tgg	aag	atg	1536
Leu	Gly	Lys	His	Ala	Lys	Leu	Ser	Leu	Gln	Glu	Leu	Thr	Trp	Lys	Met	
			500					505					510			
agc	gtg	cgg	gac	tgc	gct	tgg	ctg	cgc	agg	agc	cca	ggg	gtt	ggc	tgt	1584
Ser	Val	Arg	Asp	Cys	Ala	Trp	Leu	Arg	Arg	Ser	Pro	Gly	Val	Gly	Cys	
		515					520					525				
gtt	ccg	gcc	gca	gag	cac	cgt	ctg	cgt	gag	gag	atc	ctg	gcc	aag	ttc	1632
Val	Pro	Ala	Ala	Glu	His	Arg	Leu	Arg	Glu	Glu	Ile	Leu	Ala	Lys	Phe	
	530					535					540					
ctg	cac	tgg	ctg	atg	agt	gtg	tac	gtc	gtc	gag	ctg	ctc	agg	tct	ttc	1680
Leu	His	Trp	Leu	Met	Ser	Val	Tyr	Val	Val	Glu	Leu	Leu	Arg	Ser	Phe	
545					550					555					560	
ttt	tat	gtc	acg	gag	acc	acg	ttt	caa	aag	aac	agg	ctc	ttt	ttc	tac	1728
Phe	Tyr	Val	Thr	Glu	Thr	Thr	Phe	Gln	Lys	Asn	Arg	Leu	Phe	Phe	Tyr	
				565					570					575		
cgg	aag	agt	gtc	tgg	agc	aag	ttg	caa	agc	att	gga	atc	aga	cag	cac	1776
Arg	Lys	Ser	Val	Trp	Ser	Lys	Leu	Gln	Ser	Ile	Gly	Ile	Arg	Gln	His	
			580					585					590			
ttg	aag	agg	gtg	cag	ctg	cgg	gag	ctg	tgc	gaa	gca	gag	gtc	agg	cag	1824
Leu	Lys	Arg	Val	Gln	Leu	Arg	Glu	Leu	Ser	Glu	Ala	Glu	Val	Arg	Gln	
		595					600					605				
cat	cgg	gaa	gcc	agg	ccc	gcc	ctg	ctg	acg	tcc	aga	ctc	cgc	ttc	atc	1872
His	Arg	Glu	Ala	Arg	Pro	Ala	Leu	Leu	Thr	Ser	Arg	Leu	Arg	Phe	Ile	
	610					615					620					
ccc	aag	cct	gac	ggg	ctg	cgg	ccg	att	gtg	aac	atg	gac	tac	gtc	gtg	1920
Pro	Lys	Pro	Asp	Gly	Leu	Arg	Pro	Ile	Val	Asn	Met	Asp	Tyr	Val	Val	
625					630					635					640	
gga	gcc	aga	acg	ttc	cgc	aga	gaa	aag	agg	gcc	gag	cgt	ctc	acc	tgc	1968
Gly	Ala	Arg	Thr	Phe	Arg	Arg	Glu	Lys	Arg	Ala	Glu	Arg	Leu	Thr	Ser	
				645					650					655		

agg	gtg	aag	gca	ctg	ttc	agc	gtg	ctc	aac	tac	gag	cgg	gcg	cgg	cgc	2016
Arg	Val	Lys	Ala	Leu	Phe	Ser	Val	Leu	Asn	Tyr	Glu	Arg	Ala	Arg	Arg	
			660					665					670			
ccc	ggc	ctc	ctg	ggc	gcc	tct	gtg	ctg	ggc	ctg	gac	gat	atc	cac	agg	2064
Pro	Gly	Leu	Leu	Gly	Ala	Ser	Val	Leu	Gly	Leu	Asp	Asp	Ile	His	Arg	
		675					680				685					
gcc	tgg	cgc	acc	ttc	gtg	ctg	cgt	gtg	cgg	gcc	cag	gac	ccg	ccg	cct	2112
Ala	Trp	Arg	Thr	Phe	Val	Leu	Arg	Val	Arg	Ala	Gln	Asp	Pro	Pro	Pro	
	690					695				700						
gag	ctg	tac	ttt	gtc	aag	gtg	gat	gtg	acg	ggc	gcg	tac	gac	acc	atc	2160
Glu	Leu	Tyr	Phe	Val	Lys	Val	Asp	Val	Thr	Gly	Ala	Tyr	Asp	Thr	Ile	
705					710					715					720	
ccc	cag	gac	agg	ctc	acg	gag	gtc	atc	gcc	agc	atc	atc	aaa	ccc	cag	2208
Pro	Gln	Asp	Arg	Leu	Thr	Glu	Val	Ile	Ala	Ser	Ile	Ile	Lys	Pro	Gln	
				725					730					735		
aac	acg	tac	tgc	gtg	cgt	cgg	tat	gcc	gtg	gtc	cag	aag	gcc	gcc	cat	2256
Asn	Thr	Tyr	Cys	Val	Arg	Arg	Tyr	Ala	Val	Val	Gln	Lys	Ala	Ala	His	
			740					745					750			
ggg	cac	gtc	cgc	aag	gcc	ttc	aag	agc	cac	gtc	tct	acc	ttg	aca	gac	2304
Gly	His	Val	Arg	Lys	Ala	Phe	Lys	Ser	His	Val	Ser	Thr	Leu	Thr	Asp	
		755					760					765				
ctc	cag	ccg	tac	atg	cga	cag	ttc	gtg	gct	cac	ctg	cag	gag	acc	agc	2352
Leu	Gln	Pro	Tyr	Met	Arg	Gln	Phe	Val	Ala	His	Leu	Gln	Glu	Thr	Ser	
	770					775					780					
ccg	ctg	agg	gat	gcc	gtc	gtc	atc	gag	cag	agc	tcc	tcc	ctg	aat	gag	2400
Pro	Leu	Arg	Asp	Ala	Val	Val	Ile	Glu	Gln	Ser	Ser	Ser	Leu	Asn	Glu	
	785				790					795					800	
gcc	agc	agt	ggc	ctc	ttc	gac	gtc	ttc	cta	cgc	ttc	atg	tgc	cac	cac	2448
Ala	Ser	Ser	Gly	Leu	Phe	Asp	Val	Phe	Leu	Arg	Phe	Met	Cys	His	His	
			805						810					815		
gcc	gtg	cgc	atc	agg	ggc	aag	tcc	tac	gtc	cag	tgc	cag	ggg	atc	ccg	2496
Ala	Val	Arg	Ile	Arg	Gly	Lys	Ser	Tyr	Val	Gln	Cys	Gln	Gly	Ile	Pro	
			820					825					830			
cag	ggc	tcc	atc	ctc	tcc	acg	ctg	ctc	tgc	agc	ctg	tgc	tac	ggc	gac	2544
Gln	Gly	Ser	Ile	Leu	Ser	Thr	Leu	Leu	Cys	Ser	Leu	Cys	Tyr	Gly	Asp	
		835					840					845				
atg	gag	aac	aag	ctg	ttt	gcg	ggg	att	cgg	cgg	gac	ggg	ctg	ctc	ctg	2592

Met	Glu	Asn	Lys	Leu	Ile	Ala	Gly	Ile	Arg	Arg	Asp	Gly	Leu	Leu	Leu	
850						855					860					
cgt	ttg	gtg	gat	gat	ttc	ttg	ttg	gtg	aca	cct	cac	ctc	acc	cac	gcg	2640
Arg	Leu	Val	Asp	Asp	Phe	Leu	Leu	Val	Thr	Pro	His	Leu	Thr	His	Ala	
865					870					875					880	
aaa	acc	ttc	ctc	agg	acc	ctg	gtc	cga	ggc	gtc	cct	gag	tat	ggc	tgc	2688
Lys	Thr	Phe	Leu	Arg	Thr	Leu	Val	Arg	Gly	Val	Pro	Glu	Tyr	Gly	Cys	
				885					890					895		
gtg	gtg	aac	ttg	cgg	aag	aca	gtg	gtg	aac	ttc	cct	gta	gaa	gac	gag	2736
Val	Val	Asn	Leu	Arg	Lys	Thr	Val	Val	Asn	Phe	Pro	Val	Glu	Asp	Glu	
			900					905					910			
gcc	ctg	ggc	ggc	acg	gct	ttt	gtt	cag	atg	ccg	gcc	cac	ggc	cta	ttc	2784
Ala	Leu	Gly	Gly	Thr	Ala	Phe	Val	Gln	Met	Pro	Ala	His	Gly	Leu	Phe	
		915					920					925				
ccc	tgg	tgc	ggc	ctg	ctg	ctg	gat	acc	cgg	acc	ctg	gag	gtg	cag	agc	2832
Pro	Trp	Cys	Gly	Leu	Leu	Leu	Asp	Thr	Arg	Thr	Leu	Glu	Val	Gln	Ser	
	930					935					940					
gac	tac	tcc	agc	tat	gcc	cgg	acc	tcc	atc	aga	gcc	agt	ctc	acc	ttc	2880
Asp	Tyr	Ser	Ser	Tyr	Ala	Arg	Thr	Ser	Ile	Arg	Ala	Ser	Leu	Thr	Phe	
945					950					955					960	
aac	cgc	ggc	ttc	aag	gct	ggg	agg	aac	atg	cgt	cgc	aaa	ctc	ttt	ggg	2928
Asn	Arg	Gly	Phe	Lys	Ala	Gly	Arg	Asn	Met	Arg	Arg	Lys	Leu	Phe	Gly	
				965					970					975		
gtc	ttg	cgg	ctg	aag	tgt	cac	agc	ctg	ttt	ctg	gat	ttg	cag	gtg	aac	2976
Val	Leu	Arg	Leu	Lys	Cys	His	Ser	Leu	Phe	Leu	Asp	Leu	Gln	Val	Asn	
			980					985					990			
agc	ctc	cag	acg	gtg	tgc	acc	aac	atc	tac	aag	atc	ctc	ctg	ctg	cag	3024
Ser	Leu	Gln	Thr	Val	Cys	Thr	Asn	Ile	Tyr	Lys	Ile	Leu	Leu	Leu	Gln	
		995					1000					1005				
gcg	tac	agg	ttt	cac	gca	tgt	gtg	ctg	cag	ctc	cca	ttt	cat	cag		3069
Ala	Tyr	Arg	Phe	His	Ala	Cys	Val	Leu	Gln	Leu	Pro	Phe	His	Gln		
	1010					1015					1020					
caa	gtt	tgg	aag	aac	ccc	aca	ttt	ttc	ctg	cgc	gtc	atc	tct	gac		3114
Gln	Val	Trp	Lys	Asn	Pro	Thr	Phe	Phe	Leu	Arg	Val	Ile	Ser	Asp		
	1025					1030					1035					
acg	gcc	tcc	ctc	tgc	tac	tcc	atc	ctg	aaa	gcc	aag	aac	gca	ggg		3159
Thr	Ala	Ser	Leu	Cys	Tyr	Ser	Ile	Leu	Lys	Ala	Lys	Asn	Ala	Gly		
	1040					1045					1050					



atg	tcg	ctg	ggg	gcc	aag	ggc	gcc	gcc	ggc	cct	ctg	ccc	tcc	gag	3204
Met	Ser	Leu	Gly	Ala	Lys	Gly	Ala	Ala	Gly	Pro	Leu	Pro	Ser	Glu	
	1055					1060					1065				

gcc	gtg	cag	tgg	ctg	tgc	cac	caa	gca	ttc	ctg	ctc	aag	ctg	act	3249
Ala	Val	Gln	Trp	Leu	Cys	His	Gln	Ala	Phe	Leu	Leu	Lys	Leu	Thr	
	1070					1075					1080				

cga	cac	cgt	gtc	acc	tac	gtg	cca	ctc	ctg	ggg	tca	ctc	agg	aca	3294
Arg	His	Arg	Val	Thr	Tyr	Val	Pro	Leu	Leu	Gly	Ser	Leu	Arg	Thr	
	1085					1090					1095				

gcc	cag	acg	cag	ctg	agt	cgg	aag	ctc	ccg	ggg	acg	acg	ctg	act	3339
Ala	Gln	Thr	Gln	Leu	Ser	Arg	Lys	Leu	Pro	Gly	Thr	Thr	Leu	Thr	
	1100					1105					1110				

gcc	ctg	gag	gcc	gca	gcc	aac	ccg	gca	ctg	ccc	tca	gac	ttc	aag	3384
Ala	Leu	Glu	Ala	Ala	Ala	Asn	Pro	Ala	Leu	Pro	Ser	Asp	Phe	Lys	
	1115					1120					1125				

acc	atc	ctg	gac	tga											3399
Thr	Ile	Leu	Asp												
	1130														

<210> 4  
 <211> 1132  
 <212> PRT  
 <213> Homo sapiens

<400> 4

Met	Pro	Arg	Ala	Pro	Arg	Cys	Arg	Ala	Val	Arg	Ser	Leu	Leu	Arg	Ser
1				5					10					15	

His	Tyr	Arg	Glu	Val	Leu	Pro	Leu	Ala	Thr	Phe	Val	Arg	Arg	Leu	Gly
			20					25						30	

Pro	Gln	Gly	Trp	Arg	Leu	Val	Gln	Arg	Gly	Asp	Pro	Ala	Ala	Phe	Arg
	35						40					45			

Ala	Leu	Val	Ala	Gln	Cys	Leu	Val	Cys	Val	Pro	Trp	Asp	Ala	Arg	Pro
50						55					60				

Pro	Pro	Ala	Ala	Pro	Ser	Phe	Arg	Gln	Val	Ser	Cys	Leu	Lys	Glu	Leu
-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----

Val Ala Arg Val Leu Gln Arg Leu Cys Glu Arg Gly Ala Lys Asn Val  
85 90 95

Leu Ala Phe Gly Phe Ala Leu Leu Asp Gly Ala Arg Gly Gly Pro Pro  
100 105 110

Glu Ala Phe Thr Thr Ser Val Arg Ser Tyr Leu Pro Asn Thr Val Thr  
115 120 125

Asp Ala Leu Arg Gly Ser Gly Ala Trp Gly Leu Leu Leu Arg Arg Val  
130 135 140

Gly Asp Asp Val Leu Val His Leu Leu Ala Arg Cys Ala Leu Phe Val  
145 150 155 160

Leu Val Ala Pro Ser Cys Ala Tyr Gln Val Cys Gly Pro Pro Leu Tyr  
165 170 175

Gln Leu Gly Ala Ala Thr Gln Ala Arg Pro Pro Pro His Ala Ser Gly  
180 185 190

Pro Arg Arg Arg Leu Gly Cys Glu Arg Ala Trp Asn His Ser Val Arg  
195 200 205

Glu Ala Gly Val Pro Leu Gly Leu Pro Ala Pro Gly Ala Arg Arg Arg  
210 215 220

Gly Gly Ser Ala Ser Arg Ser Leu Pro Leu Pro Lys Arg Pro Arg Arg  
225 230 235 240

Gly Ala Ala Pro Glu Pro Glu Arg Thr Pro Val Gly Gln Gly Ser Trp  
245 250 255

Ala His Pro Gly Arg Thr Arg Gly Pro Ser Asp Arg Gly Phe Cys Val  
260 265 270

Val Ser Pro Ala Arg Pro Ala Glu Glu Ala Thr Ser Leu Glu Gly Ala  
275 280 285

Leu Ser Gly Thr Arg His Ser His Pro Ser Val Gly Arg Gln His His  
290 295 300

Ala Gly Pro Pro Ser Thr Ser Arg Pro Pro Arg Pro Trp Asp Thr Pro  
305 310 315 320

Cys Pro Pro Val Tyr Ala Glu Thr Lys His Phe Leu Tyr Ser Ser Gly  
325 330 335

Asp Lys Glu Gln Leu Arg Pro Ser Phe Leu Leu Ser Ser Leu Arg Pro  
340 345 350

Ser Leu Thr Gly Ala Arg Arg Leu Val Glu Thr Ile Phe Leu Gly Ser  
355 360 365

Arg Pro Trp Met Pro Gly Thr Pro Arg Arg Leu Pro Arg Leu Pro Gln  
370 375 380

Arg Tyr Trp Gln Met Arg Pro Leu Phe Leu Glu Leu Leu Gly Asn His  
385 390 395 400

Ala Gln Cys Pro Tyr Gly Val Leu Leu Lys Thr His Cys Pro Leu Arg  
405 410 415

Ala Ala Val Thr Pro Ala Ala Gly Val Cys Ala Arg Glu Lys Pro Gln  
420 425 430

Gly Ser Val Ala Ala Pro Glu Glu Glu Asp Thr Asp Pro Arg Arg Leu  
435 440 445

Val Gln Leu Leu Arg Gln His Ser Ser Pro Trp Gln Val Tyr Gly Phe  
450 455 460

Val Arg Ala Cys Leu Arg Arg Leu Val Pro Pro Gly Leu Trp Gly Ser

Arg His Asn Glu Arg Arg Phe Leu Arg Asn Thr Lys Lys Phe Ile Ser  
 485 490 495

Leu Gly Lys His Ala Lys Leu Ser Leu Gln Glu Leu Thr Trp Lys Met  
 500 505 510

Ser Val Arg Asp Cys Ala Trp Leu Arg Arg Ser Pro Gly Val Gly Cys  
 515 520 525

Val Pro Ala Ala Glu His Arg Leu Arg Glu Glu Ile Leu Ala Lys Phe  
 530 535 540

Leu His Trp Leu Met Ser Val Tyr Val Val Glu Leu Leu Arg Ser Phe  
 545 550 555 560

Phe Tyr Val Thr Glu Thr Thr Phe Gln Lys Asn Arg Leu Phe Phe Tyr  
 565 570 575

Arg Lys Ser Val Trp Ser Lys Leu Gln Ser Ile Gly Ile Arg Gln His  
 580 585 590

Leu Lys Arg Val Gln Leu Arg Glu Leu Ser Glu Ala Glu Val Arg Gln  
 595 600 605

His Arg Glu Ala Arg Pro Ala Leu Leu Thr Ser Arg Leu Arg Phe Ile  
 610 615 620

Pro Lys Pro Asp Gly Leu Arg Pro Ile Val Asn Met Asp Tyr Val Val  
 625 630 635 640

Gly Ala Arg Thr Phe Arg Arg Glu Lys Arg Ala Glu Arg Leu Thr Ser  
 645 650 655

Arg Val Lys Ala Leu Phe Ser Val Leu Asn Tyr Glu Arg Ala Arg Arg  
 660 665 670



Pro Gly Leu Leu Gly Ala Ser Val Leu Gly Leu Asp Asp Ile His Arg  
675 680 685

Ala Trp Arg Thr Phe Val Leu Arg Val Arg Ala Gln Asp Pro Pro Pro  
690 695 700

Glu Leu Tyr Phe Val Lys Val Asp Val Thr Gly Ala Tyr Asp Thr Ile  
705 710 715 720

Pro Gln Asp Arg Leu Thr Glu Val Ile Ala Ser Ile Ile Lys Pro Gln  
725 730 735

Asn Thr Tyr Cys Val Arg Arg Tyr Ala Val Val Gln Lys Ala Ala His  
740 745 750

Gly His Val Arg Lys Ala Phe Lys Ser His Val Ser Thr Leu Thr Asp  
755 760 765

Leu Gln Pro Tyr Met Arg Gln Phe Val Ala His Leu Gln Glu Thr Ser  
770 775 780

Pro Leu Arg Asp Ala Val Val Ile Glu Gln Ser Ser Ser Leu Asn Glu  
785 790 795 800

Ala Ser Ser Gly Leu Phe Asp Val Phe Leu Arg Phe Met Cys His His  
805 810 815

Ala Val Arg Ile Arg Gly Lys Ser Tyr Val Gln Cys Gln Gly Ile Pro  
820 825 830

Gln Gly Ser Ile Leu Ser Thr Leu Leu Cys Ser Leu Cys Tyr Gly Asp  
835 840 845

Met Glu Asn Lys Leu Phe Ala Gly Ile Arg Arg Asp Gly Leu Leu Leu  
850 855 860

Arg Leu Val Asp Asp Phe Leu Leu Val Thr Pro His Leu Thr His Ala

Lys Thr Phe Leu Arg Thr Leu Val Arg Gly Val Pro Glu Tyr Gly Cys  
885 890 895

Val Val Asn Leu Arg Lys Thr Val Val Asn Phe Pro Val Glu Asp Glu  
900 905 910

Ala Leu Gly Gly Thr Ala Phe Val Gln Met Pro Ala His Gly Leu Phe  
915 920 925

Pro Trp Cys Gly Leu Leu Leu Asp Thr Arg Thr Leu Glu Val Gln Ser  
930 935 940

Asp Tyr Ser Ser Tyr Ala Arg Thr Ser Ile Arg Ala Ser Leu Thr Phe  
945 950 955 960

Asn Arg Gly Phe Lys Ala Gly Arg Asn Met Arg Arg Lys Leu Phe Gly  
965 970 975

Val Leu Arg Leu Lys Cys His Ser Leu Phe Leu Asp Leu Gln Val Asn  
980 985 990

Ser Leu Gln Thr Val Cys Thr Asn Ile Tyr Lys Ile Leu Leu Leu Gln  
995 1000 1005

Ala Tyr Arg Phe His Ala Cys Val Leu Gln Leu Pro Phe His Gln  
1010 1015 1020

Gln Val Trp Lys Asn Pro Thr Phe Phe Leu Arg Val Ile Ser Asp  
1025 1030 1035

Thr Ala Ser Leu Cys Tyr Ser Ile Leu Lys Ala Lys Asn Ala Gly  
1040 1045 1050

Met Ser Leu Gly Ala Lys Gly Ala Ala Gly Pro Leu Pro Ser Glu  
1055 1060 1065

Ala Val Gln Trp Leu Cys His Gln Ala Phe Leu Leu Lys Leu Thr  
1070 1075 1080

Arg His Arg Val Thr Tyr Val Pro Leu Leu Gly Ser Leu Arg Thr  
1085 1090 1095

Ala Gln Thr Gln Leu Ser Arg Lys Leu Pro Gly Thr Thr Leu Thr  
1100 1105 1110

Ala Leu Glu Ala Ala Ala Asn Pro Ala Leu Pro Ser Asp Phe Lys  
1115 1120 1125

Thr Ile Leu Asp  
1130

<210> 5  
<211> 1149  
<212> DNA  
<213> Artificial

<220>  
<223> A polynucleotide that codes for inactive variant of MAPKAPK3 (SEQ  
ID NO:2) which amino acid residues at positions 201 and 313 are  
both replaced to alanine from threonine

<400> 5  
atggatgggtg aaacagcaga ggagcagggg ggccctgtgc ccccgccagt tgcacccggc 60  
ggacccggct tgggcgggtgc tccggggggg cggcgggagc ccaagaagta cgcagtgacc 120  
gacgactacc agttgtccaa gcagggtgctg ggccctgggtg tgaacggcaa agtgctggag 180  
tgcttccatc ggcgcactgg acagaagtgt gccctgaagc tcctgtatga cagccccaag 240  
gcccggcagg aggtagacca tcactggcag gcttctggcg gccccatat tgtctgcata 300  
ctggatgtgt atgagaacat gcaccatggc aagcgcgtgc tcctcatcat catggaatgc 360  
atggaagggtg gtgagttgtt cagcaggatt caggagcgtg gcgaccaggc ttctactgag 420  
agagaagctg cagagataat gcgggatatt ggcactgcca tccagtttct gcacagccat 480  
aacattgccc accgagatgt caagcctgaa aacctactct acacatctaa ggagaaagac 540

```

gcaagtgcctta agcttcacccga tttctggcttct gcttaaggaga ccaacccaaaa tgccttcgcag      000
gccccctgct atactcccta ttatgtggcc cctgagggtcc tgggtccaga gaagtatgac      660
aagtcattgtg acatgtggtc cctgggtgtc atcatgtaca tcctcctttg tggcttccca      720
cccttctact ccaacacggg ccaggccatc tccccgggga tgaagaggag gattcgcctg      780
ggccagtacg gcttccccaa tcctgagtgg tcagaagtct ctgaggatgc caagcagctg      840
atccgcctcc tgttgaagac agaccccaca gagaggctga ccatcactca gttcatgaac      900
cacccttgga tcaaccaatc gatggtagtg ccacaggccc cactccacac ggcccgagtg      960
ctgcaggagg acaaagacca ctgggacgaa gtcaaggagg agatgaccag tgccttggcc     1020
actatgcggg tagactacga ccagggtgaag atcaaggacc tgaagacctc taacaaccgg     1080
ctcctcaaca agaggagaaa aaagcaggca ggcagctcct ctgcctcaca gggctgcaac     1140
aaccagtag                                     1149

```

<210> 6

<211> 382

<212> PRT

<213> Artificial

<220>

<223> Inactive variant of MAPKAPK3 (SEQ ID NO:2) which amino acid residues at positions 201 and 313 are both replaced to alanine from threonine

<400> 6

```

Met Asp Gly Glu Thr Ala Glu Glu Gln Gly Gly Pro Val Pro Pro Pro
1          5          10          15

```

```

Val Ala Pro Gly Gly Pro Gly Leu Gly Gly Ala Pro Gly Gly Arg Arg
20          25          30

```

```

Glu Pro Lys Lys Tyr Ala Val Thr Asp Asp Tyr Gln Leu Ser Lys Gln
35          40          45

```

```

Val Leu Gly Leu Gly Val Asn Gly Lys Val Leu Glu Cys Phe His Arg
50          55          60

```



Arg Thr Gly Gln Lys Cys Ala Leu Lys Leu Leu Tyr Asp Ser Pro Lys  
65 70 75 80

Ala Arg Gln Glu Val Asp His His Trp Gln Ala Ser Gly Gly Pro His  
85 90 95

Ile Val Cys Ile Leu Asp Val Tyr Glu Asn Met His His Gly Lys Arg  
100 105 110

Cys Leu Leu Ile Ile Met Glu Cys Met Glu Gly Gly Glu Leu Phe Ser  
115 120 125

Arg Ile Gln Glu Arg Gly Asp Gln Ala Phe Thr Glu Arg Glu Ala Ala  
130 135 140

Glu Ile Met Arg Asp Ile Gly Thr Ala Ile Gln Phe Leu His Ser His  
145 150 155 160

Asn Ile Ala His Arg Asp Val Lys Pro Glu Asn Leu Leu Tyr Thr Ser  
165 170 175

Lys Glu Lys Asp Ala Val Leu Lys Leu Thr Asp Phe Gly Phe Ala Lys  
180 185 190

Glu Thr Thr Gln Asn Ala Leu Gln Ala Pro Cys Tyr Thr Pro Tyr Tyr  
195 200 205

Val Ala Pro Glu Val Leu Gly Pro Glu Lys Tyr Asp Lys Ser Cys Asp  
210 215 220

Met Trp Ser Leu Gly Val Ile Met Tyr Ile Leu Leu Cys Gly Phe Pro  
225 230 235 240

Pro Phe Tyr Ser Asn Thr Gly Gln Ala Ile Ser Pro Gly Met Lys Arg  
245 250 255

Arg Ile Arg Leu Gly Gln Tyr Gly Phe Pro Asn Pro Glu Trp Ser Glu

Val Ser Glu Asp Ala Lys Gln Leu Ile Arg Leu Leu Leu Lys Thr Asp  
 275 280 285

Pro Thr Glu Arg Leu Thr Ile Thr Gln Phe Met Asn His Pro Trp Ile  
 290 295 300

Asn Gln Ser Met Val Val Pro Gln Ala Pro Leu His Thr Ala Arg Val  
 305 310 315 320

Leu Gln Glu Asp Lys Asp His Trp Asp Glu Val Lys Glu Glu Met Thr  
 325 330 335

Ser Ala Leu Ala Thr Met Arg Val Asp Tyr Asp Gln Val Lys Ile Lys  
 340 345 350

Asp Leu Lys Thr Ser Asn Asn Arg Leu Leu Asn Lys Arg Arg Lys Lys  
 355 360 365

Gln Ala Gly Ser Ser Ser Ala Ser Gln Gly Cys Asn Asn Gln  
 370 375 380

<210> 7

<211> 1149

<212> DNA

<213> Artificial

<220>

<223> A polynucleotide that codes for active variant of MAPKAPK3 (SEQ I  
 D NO:2) which amino acid residues at positions 201 and 313 are bo  
 th replaced to glutamic acid from threonine

<400> 7

atggatggtg aaacagcaga ggagcagggg ggccctgtgc ccccgccagt tgcacccggc 60

ggacccggct tgggcgggtgc tccggggggg cggcgggagc ccaagaagta cgcagtgacc 120

gacgactacc agttgtccaa gcagggtgctg ggcctgggtg tgaacggcaa agtgctggag 180

tgccttccatc ggcgcaactgg acagaagtgt gccctgaagc tcctgtatga cagccccaag 240

```

gtcccgccagg aggtagacca tccctggcag gcttcggcgg gcccccaaat tgcctgcatt 300
ctggatgtgt atgagaacat gcaccatggc aagcgcctgt tcctcatcat catggaatgc 360
atggaagggtg gtgagttgtt cagcaggatt caggagcgtg gcgaccaggc ttctactgag 420
agagaagctg cagagataat gcgggatat tggcactgcc tccagtttct gcacagccat 480
aacattgccc accgagatgt caagcctgaa aacctactct acacatctaa ggagaaagac 540
gcagtgccta agctcaccga ttttggcctt gctaaggaga ccacccaaaa tgccctgcag 600
gagccctgct atactcccta ttatgtggcc cctgagggtc tgggtccaga gaagtatgac 660
aagtcattgt acatgtggtc cctgggtgtc atcatgtaca tcctcctttg tggcttccca 720
cccttctact ccaacacggg ccaggccatc tccccgggga tgaagaggag gattcgcctg 780
ggccagtagc gcttcccca tccctgagtgg tcagaagtct ctgaggatgc caagcagctg 840
atccgcctcc tggtgaagac agaccccaca gagaggctga ccatcactca gtatcatgac 900
cacccttgga tcaaccaatc gatggtagtg ccacaggagc cactccacac ggcccgagtg 960
ctgcaggagg acaaagacca ctgggacgaa gtcaaggagg agatgaccag tgccttggcc 1020
actatgcggg tagactacga ccagggtgaag atcaaggacc tgaagacctc taacaaccgg 1080
ctcctcaaca agaggagaaa aaagcaggca ggcagctcct ctgcctcaca gggctgcaac 1140
aaccagtag 1149

```

<210> 8

<211> 382

<212> PRT

<213> Artificial

<220>

<223> Active variant of MAPKAPK3 (SEQ ID NO:2) which amino acid residues at positions 201 and 313 are both replaced to glutamic acid from threonine

<400> 8

```

Met Asp Gly Glu Thr Ala Glu Glu Gln Gly Gly Pro Val Pro Pro Pro
1          5          10          15

```

```

Val Ala Pro Gly Gly Pro Gly Leu Gly Gly Ala Pro Gly Gly Arg Arg

```

Glu Pro Lys Lys Tyr Ala Val Thr Asp Asp Tyr Gln Leu Ser Lys Gln  
 35 40 45

Val Leu Gly Leu Gly Val Asn Gly Lys Val Leu Glu Cys Phe His Arg  
 50 55 60

Arg Thr Gly Gln Lys Cys Ala Leu Lys Leu Leu Tyr Asp Ser Pro Lys  
 65 70 75 80

Ala Arg Gln Glu Val Asp His His Trp Gln Ala Ser Gly Gly Pro His  
 85 90 95

Ile Val Cys Ile Leu Asp Val Tyr Glu Asn Met His His Gly Lys Arg  
 100 105 110

Cys Leu Leu Ile Ile Met Glu Cys Met Glu Gly Gly Glu Leu Phe Ser  
 115 120 125

Arg Ile Gln Glu Arg Gly Asp Gln Ala Phe Thr Glu Arg Glu Ala Ala  
 130 135 140

Glu Ile Met Arg Asp Ile Gly Thr Ala Ile Gln Phe Leu His Ser His  
 145 150 155 160

Asn Ile Ala His Arg Asp Val Lys Pro Glu Asn Leu Leu Tyr Thr Ser  
 165 170 175

Lys Glu Lys Asp Ala Val Leu Lys Leu Thr Asp Phe Gly Phe Ala Lys  
 180 185 190

Glu Thr Thr Gln Asn Ala Leu Gln Glu Pro Cys Tyr Thr Pro Tyr Tyr  
 195 200 205

Val Ala Pro Glu Val Leu Gly Pro Glu Lys Tyr Asp Lys Ser Cys Asp  
 210 215 220



Met	Trp	Ser	Leu	Gly	Val	Ile	Met	Tyr	Ile	Leu	Leu	Cys	Gly	Phe	Pro	225	230	235	240
Pro	Phe	Tyr	Ser	Asn	Thr	Gly	Gln	Ala	Ile	Ser	Pro	Gly	Met	Lys	Arg	245	250	255	
Arg	Ile	Arg	Leu	Gly	Gln	Tyr	Gly	Phe	Pro	Asn	Pro	Glu	Trp	Ser	Glu	260	265	270	
Val	Ser	Glu	Asp	Ala	Lys	Gln	Leu	Ile	Arg	Leu	Leu	Leu	Lys	Thr	Asp	275	280	285	
Pro	Thr	Glu	Arg	Leu	Thr	Ile	Thr	Gln	Phe	Met	Asn	His	Pro	Trp	Ile	290	295	300	
Asn	Gln	Ser	Met	Val	Val	Pro	Gln	Glu	Pro	Leu	His	Thr	Ala	Arg	Val	305	310	315	320
Leu	Gln	Glu	Asp	Lys	Asp	His	Trp	Asp	Glu	Val	Lys	Glu	Glu	Met	Thr	325	330	335	
Ser	Ala	Leu	Ala	Thr	Met	Arg	Val	Asp	Tyr	Asp	Gln	Val	Lys	Ile	Lys	340	345	350	
Asp	Leu	Lys	Thr	Ser	Asn	Asn	Arg	Leu	Leu	Asn	Lys	Arg	Arg	Lys	Lys	355	360	365	
Gln	Ala	Gly	Ser	Ser	Ser	Ala	Ser	Gln	Gly	Cys	Asn	Asn	Gln			370	375	380	

<210> 9

<211> 6

<212> PRT

<213> Artificial

<220>

<223> Partial sequence of TERT (SEQ ID NO:4) , which is highly homologous to that of MAPKAPK3 (SEQ ID NO:2)

<400> 9

Pro Pro Pro Ala Ala Pro  
1 5

<210> 10

<211> 6

<212> PRT

<213> Artificial

<220>

<223> Partial sequence of MAPKAPK3 (SEQ ID NO:2) , which is highly homologous to that of TERT (SEQ ID NO:4)

<400> 10

Pro Pro Pro Val Ala Pro  
1 5

<210> 11

<211> 6

<212> PRT

<213> Artificial

<220>

<223> Partial sequence of TERT (SEQ ID NO:4) , which is highly homologous to that of MAPKAPK3 (SEQ ID NO:2)

<400> 11

Ala Pro Gly Ala Arg Arg  
1 5

<210> 12

<211> 6

<212> PRT

<213> Artificial

<220>

<223> Partial sequence of MAPKAPK3 (SEQ ID NO:2) , which is highly homologous to that of TERT (SEQ ID NO:4)

<400> 12

Ala Pro Gly Gly Arg Arg  
1 5

-  
•

<210> 13  
<211> 5  
<212> PRT  
<213> Artificial

<220>  
<223> Partial sequence identical in the sequences of TERT (SEQ ID NO:4)  
and MAPKAPK3 (SEQ ID NO:2)

<400> 13

Ala Arg Val Leu Gln  
1 5

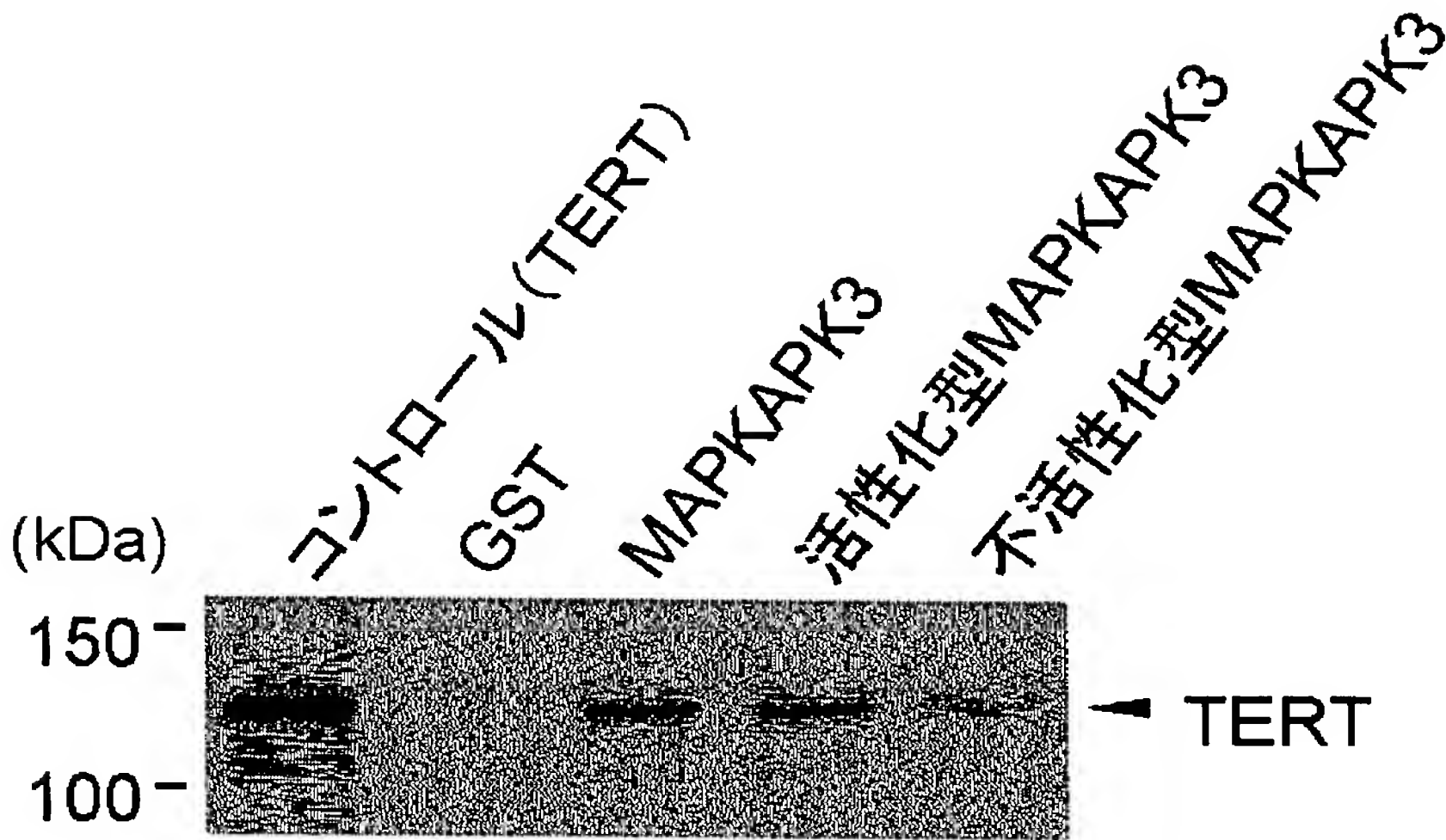
【図 1】

64 PPPAAP (TERT) (配列番号9)  
14 PPPVAP (MAPKAPK3) (配列番号10)  
PPP AP

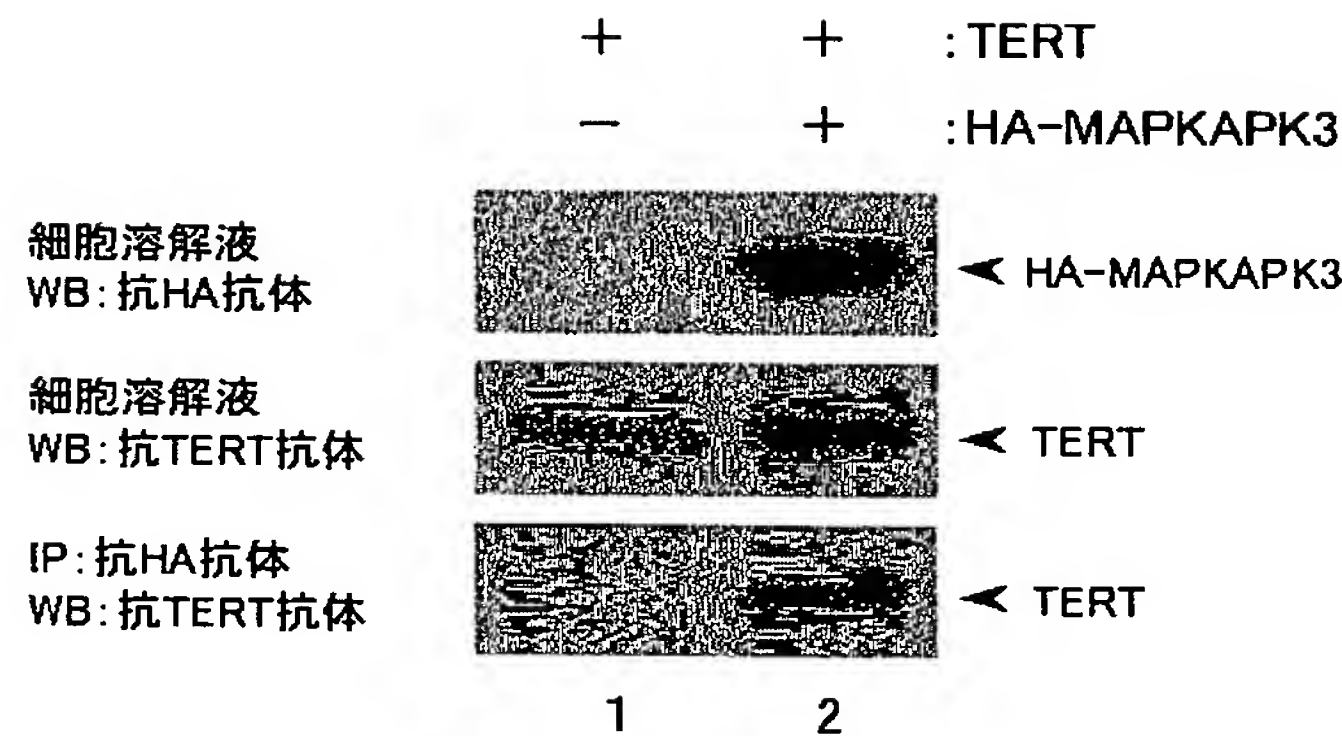
218 APGARR (TERT) (配列番号11)  
27 APGGRR (MAPKAPK3) (配列番号12)  
APG RR

82 ARVLQ (TERT) (配列番号13)  
318 ARVLQ (MAPKAPK3)  
ARVLQ

【図 2】

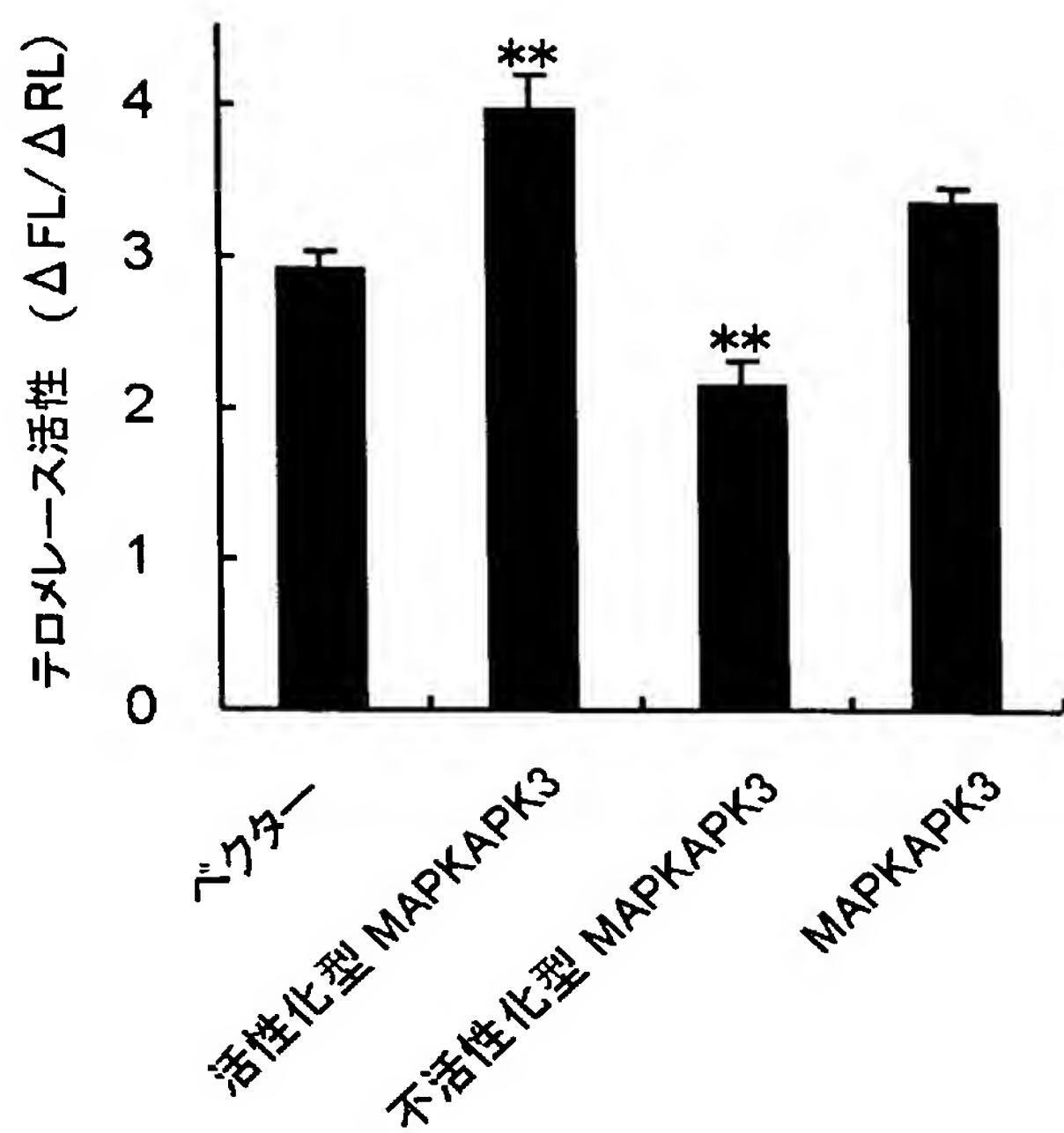


【図 3】

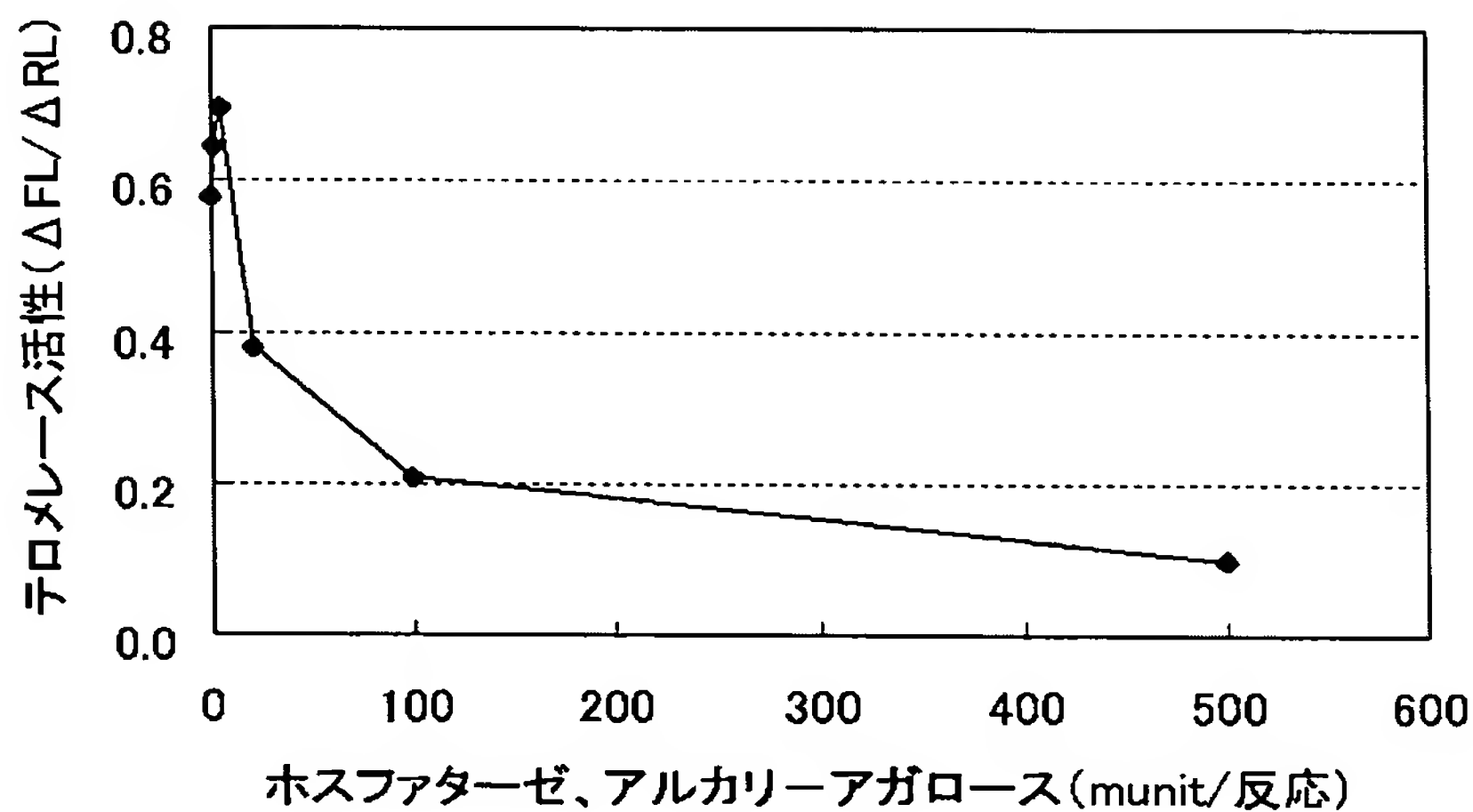




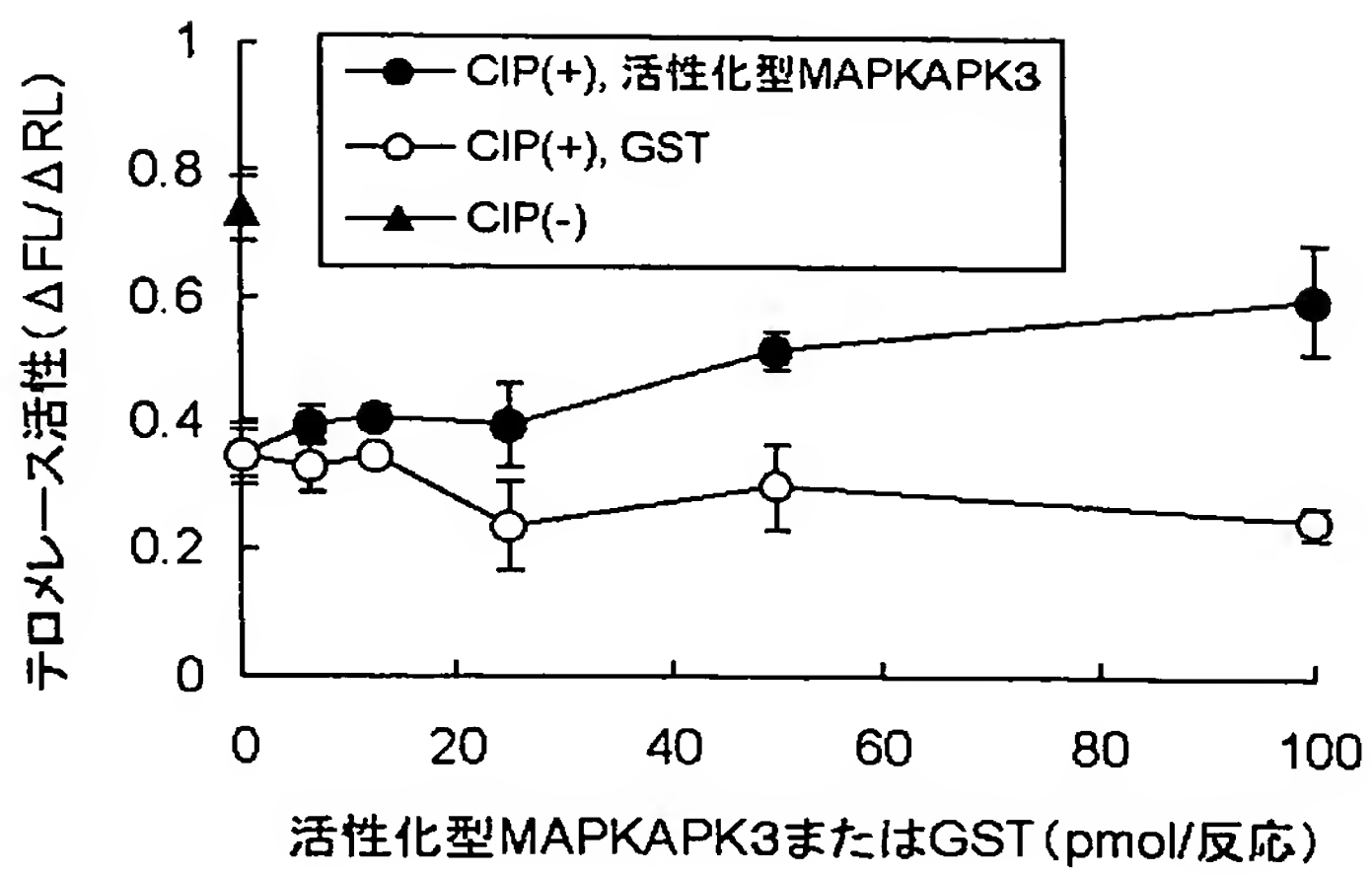
【図 4】



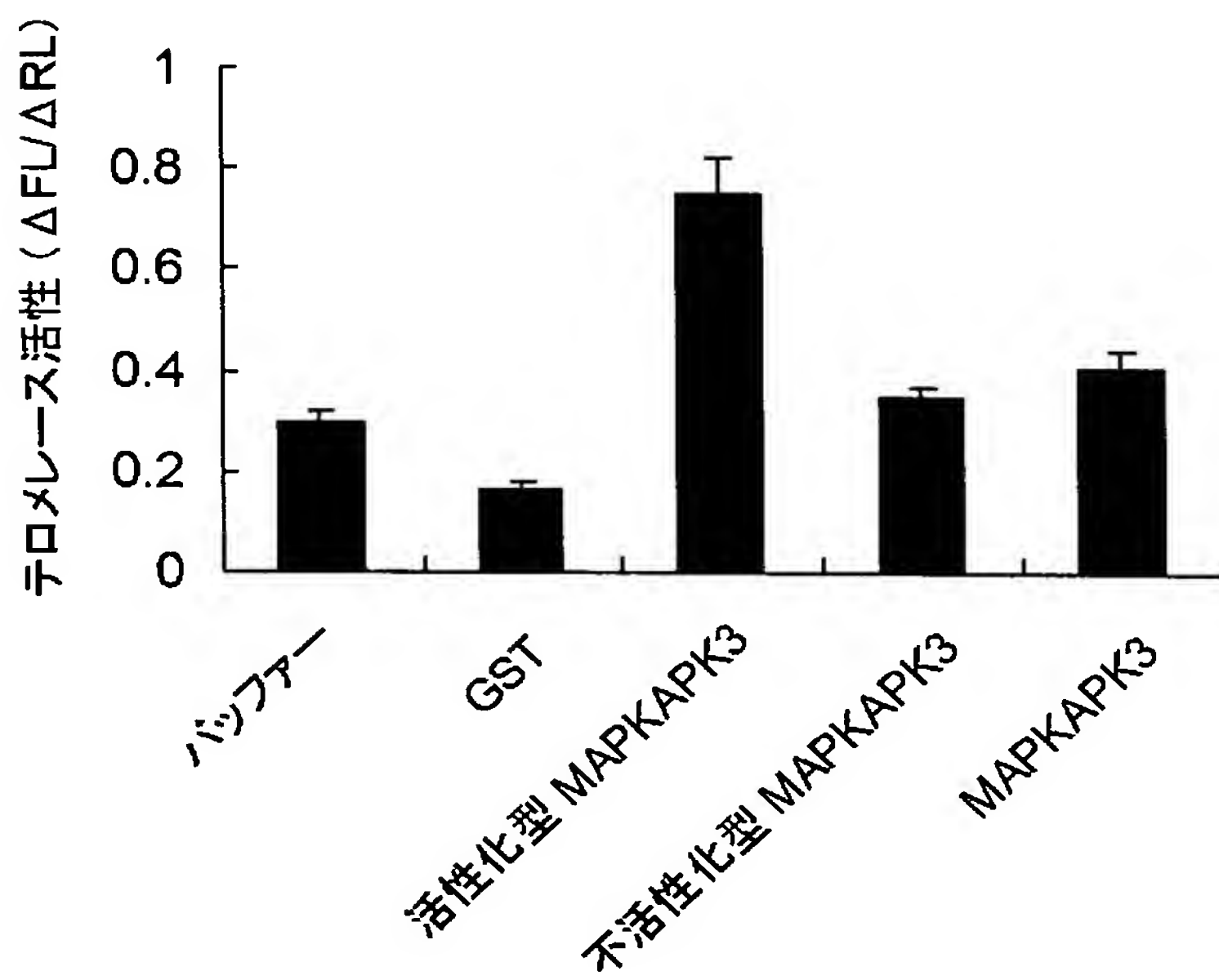
【図 5】



【図 6】



【図 7】



【要約】

【課題】 テロメラーズの活性化に関与する蛋白質を見出し、該蛋白質によるテロメラーズの活性化を阻害することにより、癌細胞など不死化した細胞の細胞増殖を阻害して細胞死を誘導し、ひいては癌疾患の防止および／または治療を可能にする手段を提供すること。

【解決手段】 テロメラーズの触媒サブユニットであるTERTとMAPKAPK3の結合を阻害することまたは活性化型MAPKAPK3によるTERTのリン酸化阻害することとを特徴とする、テロメラーズ活性化阻害方法およびテロメラーズ活性化阻害剤、テロメラーズ活性阻害方法およびテロメラーズ活性阻害剤、癌疾患の防止方法および／または治療方法、癌疾患の防止剤および／または治療剤、TERTとMAPKAPK3の結合を阻害する化合物または活性化型MAPKAPK3によるTERTのリン酸化を阻害する化合物の同定方法、並びに試薬キット。

【官 報 名】	山 崎 八 右 衛 門 文 治
【整理番号】	NP03-1177
【あて先】	特許庁長官殿
【事件の表示】	
【出願番号】	特願2004-143902
【承継人】	
【識別番号】	000002831
【氏名又は名称】	第一製薬株式会社
【承継人代理人】	
【識別番号】	100088904
【弁理士】	
【氏名又は名称】	庄 司    隆
【手数料の表示】	
【予納台帳番号】	067070
【納付金額】	4,200円



0 0 0 0 0 2 8 3 1

19900828

新規登録

東京都中央区日本橋3丁目14番10号

第一製薬株式会社

5 0 0 5 2 0 6 2 8

20001026

新規登録

千葉県千葉市美浜区中瀬1丁目3番地 幕張テクノガーデンD1  
7

セレスター・レキシコ・サイエンシズ株式会社

# Document made available under the Patent Cooperation Treaty (PCT)

International application number: PCT/JP05/008239

International filing date: 28 April 2005 (28.04.2005)

Document type: Certified copy of priority document

Document details: Country/Office: JP  
Number: 2004-143902  
Filing date: 13 May 2004 (13.05.2004)

Date of receipt at the International Bureau: 24 June 2005 (24.06.2005)

Remark: Priority document submitted or transmitted to the International Bureau in compliance with Rule 17.1(a) or (b)



World Intellectual Property Organization (WIPO) - Geneva, Switzerland  
Organisation Mondiale de la Propriété Intellectuelle (OMPI) - Genève, Suisse

**This Page is Inserted by IFW Indexing and Scanning  
Operations and is not part of the Official Record**

**BEST AVAILABLE IMAGES**

Defective images within this document are accurate representations of the original documents submitted by the applicant.

Defects in the images include but are not limited to the items checked:

- ☐ **BLACK BORDERS**
- ☐ **IMAGE CUT OFF AT TOP, BOTTOM OR SIDES**
- ☐ **FADED TEXT OR DRAWING**
- ☐ **BLURRED OR ILLEGIBLE TEXT OR DRAWING**
- ☐ **SKEWED/SLANTED IMAGES**
- ☒ **COLOR OR BLACK AND WHITE PHOTOGRAPHS**
- ☐ **GRAY SCALE DOCUMENTS**
- ☐ **LINES OR MARKS ON ORIGINAL DOCUMENT**
- ☐ **REFERENCE(S) OR EXHIBIT(S) SUBMITTED ARE POOR QUALITY**
- ☐ **OTHER:** \_\_\_\_\_

**IMAGES ARE BEST AVAILABLE COPY.**

**As rescanning these documents will not correct the image problems checked, please do not report these problems to the IFW Image Problem Mailbox.**